



**Universidad  
Andrés Bello**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Medicina

Escuela de Tecnología Médica

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIAGREGANTE DE COMPUESTOS  
NATURALES, FRENTE A LA AGREGACIÓN DE  $\alpha$ -SINUCLEÍNA**

Unidad de Investigación para optar al Título de Tecnólogo Médico mención  
Bioanálisis clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre

Autor: Luis Alberto Machuca Moreno  
Profesor tutor: Alberto Jesús Cornejo Mora

Santiago de Chile, 2017

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiar parte de mi espiritualidad, a mis familiares que con el paso de los años me han acompañado desde un plano celestial, a mi familia por haberme inculcado la responsabilidad, el valor, el esfuerzo ante la adversidad y la unidad entre todos y ante todo lo que se presente a lo largo del caminar. Sin cada uno de ellos, difícilmente hubiera sido posible alcanzar esa tranquilidad necesaria durante la Universidad.

A mi tutor y profesor Dr. Alberto Cornejo por cada uno de sus consejos en el ámbito universitario como personal, especialmente durante la investigación, así como también, antes de iniciar mi Internado Clínico.

A Patricio Muñoz, Cecilia Quiroga y Leonel Garcés, miembros del Laboratorio CATEM por su apoyo durante la realización de la investigación.

La vida va dejando huellas que de una u otra forma van marcando el quehacer diario, sobre todo cuando día a día te enfrentas a los grandes temores que en algún minuto te asustaron, sin embargo, debes ser capaz de buscar la forma de levantarte, pelear, y disfrutar de cada una de las bondades que tu propio esfuerzo te ha recompensado. El miedo sin lugar a duda es quien te recuerda que aun eres humano y perfectamente puedes fallar.

*“Si caes siete veces, levántate ocho”*

Proverbio Chino

## INDICE

RESUMEN.....	VII
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN .....	8
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO .....	11
2.1 $\alpha$ -sinucleína.....	11
2.1.1 Estructura .....	11
2.1.2 Función fisiológica .....	14
2.1.3 Agregación proteica.....	15
2.2 Búsqueda de nuevas opciones al tratamiento actual de la EP.....	24
2.2.1 Estudios previos con moléculas antioxidantes .....	26
2.3 Técnicas de monitoreo de agregación .....	27
2.3.1 ThT .....	27
2.4 Técnicas de purificación y separación de proteínas.....	28
2.4.1 Cromatografía de afinidad a metales (IMAC) .....	28
2.4.2 Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) .....	29
CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	30
3.1 Hipótesis .....	30
3.2 Objetivos .....	30
3.2.1 Objetivo general .....	30
3.2.2 Objetivos específicos.....	30
CAPÍTULO 4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Materiales.....	31
4.1.1 Biológico .....	31
4.1.2 Reactivos y soluciones .....	31
4.2 Equipos .....	34
4.3 Método .....	34

4.3.1 Tipo de estudio y lugar de realización .....	34
4.3.2 Clonamiento de $\alpha$ -sinucleína humana recombinante.....	35
4.3.3 Cultivo de células competentes .....	37
4.3.4 Cultivo y producción de proteína recombinante.....	39
4.3.5 Separación y purificación proteica .....	40
4.3.6 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) .....	41
4.3.7 Diálisis y concentración proteica .....	43
4.3.8 Medición de la concentración proteica.....	44
4.3.9 Ensayo de agregación in vitro, monitoreado con ThT.....	45
4.3.10 Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	46
4.3.11 Análisis de datos y procesamiento de imágenes .....	47
CAPÍTULO 5 RESULTADOS.....	48
5.1 Producción de $\alpha$ -sinucleína recombinante .....	48
5.2 Purificación de $\alpha$ -sinucleína mediante IMAC.....	49
5.3 Ensayo in vitro de agregación con ThT .....	51
5.4 Separación de especies utilizando columna SEC .....	56
CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN .....	59
CAPÍTULO 7 CONCLUSIÓN .....	68
CAPÍTULO 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Secuencia aminoacídica de la $\alpha$ -sinucleína.....	12
Figura 2 Esquema de las tres regiones de la $\alpha$ -sinucleína [3] .....	12
Figura 3 Funciones fisiológicas de la $\alpha$ -sinucleína. ....	15
Figura 4 CL y NL en pacientes con EP (A y B) y DCL (C). ....	16
Figura 5 Representación del proceso de agregación de la $\alpha$ -sinucleína. ....	18
Figura 6 Mecanismo de agregación de la $\alpha$ -sinucleína [5].....	19
Figura 7 Presencia de $\alpha$ -sinucleína en otras regiones cerebrales. ....	23
Figura 8 Modelo que explica la toxicidad y propagación de la $\alpha$ -sinucleína. ....	24
Figura 9 Modelo de canal de la fibra amiloide, además de la unión del ThT a los sitios de unión [59]. ....	27
Figura 10 Mapa de la estructura del vector pET-28a(+) [68]. ....	36
Figura 11 SDS-PAGE Acrilamida/bis-acrilamida 15%. ....	48
Figura 12 Cromatograma generado mediante la purificación de $\alpha$ -sinucleína con la columna IMAC.....	49
Figura 13 SDS-PAGE Acrilamida/bis-acrilamida 15%. ....	50
Figura 14 Grafico del screening realizado con las seis moléculas.....	52
Figura 15 Grafico del ensayo de agregación in vitro de dosis-respuesta de la MLC6. ....	53
Figura 16 Determinación del IC <sub>50</sub> . ....	54
Figura 17 Comparación de la actividad inhibitoria de la MLC6 en presencia y ausencia de heparina.....	55
Figura 18 Cromatogramas obtenidos de la separación de las alícuotas mediante columna SEC .....	57

## INDICE DE TABLA

Tabla 1 Protocolo para la generación del gradiente de concentración. ....	41
Tabla 2 Volumen para la preparación de dos geles de poliacrilamida preparados al 15% de concentración de acrilamida .....	42
Tabla 3 Protocolo utilizado para la generación del gradiente de concentración. .....	47
Tabla 4 Porcentajes de inhibición de las seis moléculas en estudio.....	53
Tabla 5 Porcentajes de inhibición de las cinco concentraciones utilizadas para el ensayo de dosis-respuesta. ....	54
Tabla 6 Porcentaje de inhibición de la MLC6 .....	56

## RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo, caracterizado por la presencia de tres síntomas principales tales como: (i) rigidez muscular, (ii) bradicinesia y (iii) temblor en reposo, además, puede presentarse inestabilidad postural y disminución de la expresión facial en los pacientes. Epidemiológicamente, afecta al 2-3% de la población mayor a 65 años, elevándose a un 3-5% en mayores de 80 años, presentando predominancia en el sexo masculino, siendo infrecuente antes de los 50 años. Con respecto a la patogénesis de la enfermedad, se describe la presencia de inclusiones citoplasmáticas en neuronas dopaminérgicas ubicadas en la *Sustancia nigra pars compacta*, llamados cuerpos de Lewy, los cuales poseen como principal compuesto la  $\alpha$ -sinucleína. Actualmente el tratamiento es la levodopa, la cual posee un enfoque paliativo de la enfermedad, debido a que disminuye la sintomatología clásica, sin embargo, no evita la progresión de la enfermedad. Es por esto, que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas al tratamiento actual, y que actúen evitando la progresión de la enfermedad, específicamente interactuando en el proceso de agregación, debido a los efectos citotóxicos de los oligómeros. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el nivel de inhibición de la agregación que presentaban seis polifenoles derivados del extracto del *Rosmarinus officinalis*, realizando ensayos de agregación *in vitro* utilizando  $\alpha$ -sinucleína recombinante, siendo monitoreados por Tioflavina-T (ThT) luego de 24 horas de incubación. Se realizó un screening de las seis moléculas, realizando posteriormente un ensayo de dosis-respuesta de la molécula que presentó mayor inhibición, para luego separar las estructuras formadas en presencia y ausencia del polifenol mediante cromatografía por exclusión de tamaño. A su vez, se comparó el efecto de la molécula en presencia de un inductor de la agregación, obteniendo diferencias significativas entre ambas condiciones.

Palabras clave: parkinson,  $\alpha$ -sinucleína, ThT.

## CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo motor, caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas ubicadas en la *sustancia nigra pars compacta* [1]. Fue descrita por primera vez, en el año 1817 por James Parkinson por el nombre de parálisis agitante [2]. Asimismo, en el año 1912 Friederich Lewy, describió inclusiones eosinofílicas localizadas en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas, denominándolas como cuerpos de Lewy (CL) [3]. Describió también, estructuras en los axones neuronales, siendo definidas posteriormente como neuritas de Lewy (NL) [4].

Ambas estructuras se componen de ubiquitina y en mayor cantidad  $\alpha$ -sinucleína, siendo esta última la responsable del aumento del estrés oxidativo al interior de la célula, luego de cambiar su conformación de  $\alpha$ -hélice a hoja- $\beta$ , desencadenando la permeabilización de la membrana, la pérdida de la transmisión de neurotransmisores y por consecuencia, la muerte celular [3,5].

La enfermedad se caracteriza por la presencia de tres síntomas clásicos: (i) temblor en reposo, (ii) bradicinesia, que corresponde a la lentificación del movimiento y (iii) rigidez muscular. Se describe, además, inestabilidad postural, expresión facial de máscara y flexión postural [1,3,5]. Debido al daño neurológico que sufren los pacientes, se han observado desordenes cognitivos como demencia, déficit atencional, problemas para el procesamiento visual-espacial y pérdida de memoria, sin embargo, es complejo aun atribuirlo solamente a la EP, ya que puede correlacionarse como consecuencia de la edad avanzada de los pacientes [6].

Epidemiológicamente, la enfermedad inicia entre los 50 a 60 años, afectando a un 1-2% de la población mayor de 65 años, elevándose a un 3-5% en mayores de 85 años. En Chile, el grupo etario mayor a 60 años corresponde al 11,4% de



la población, y el grupo etario mayor a los 65 años al 8%, estimándose para el año 2050 que habrá cerca de un 23,5% de adultos mayores sobre los 60 años de edad [7]. Un estudio realizado en el año 2013 en Chile señaló que existen cerca de 40.000 pacientes con EP, y se detectó que, entre los años 1997 y 2008, hubo un incremento en la tasa de mortalidad cruda, aumentando desde 0,79 en 1997 hasta 3,0 en 2008 [8].

En la actualidad, la EP es tratada farmacológicamente con levodopa, debido a que la dopamina no puede cruzar la barrera hematoencefálica. El fármaco actúa en diferentes vías metabólicas a nivel neuronal, experimentando el paciente mejoría sustancial de la sintomatología clásica de la enfermedad, sin embargo, tras 5 años del tratamiento, cerca del 40% de los pacientes desarrollan complicaciones secundarias, asociadas a una disminución del efecto, junto a la aparición de movimientos espontáneos [9].

Es por esto, que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas al tratamiento actual de la EP, especialmente hacia la exploración de moléculas que actualmente son conocidas por poseer capacidades antioxidantes. Numerosos estudios han señalado que los catecoles, que son moléculas con propiedades antioxidantes, tendrían la capacidad de unirse a especies tóxicas a nivel celular, estableciendo un equilibrio entre ellas, permitiendo su eliminación [10], siendo similar al efecto producido por la dopamina al inhibir la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, formando oligómeros solubles, sin capacidad agregante ni neurotóxica [11]. Un estudio reciente demostró la capacidad del ácido fúlvico, la cual es una molécula de origen natural con propiedades antioxidantes, de poder inhibir el proceso de formación de fibras amiloides, favoreciendo la desestabilización de las fibras que la componen, impidiendo su agregación [12].

Dados los estudios realizados sobre la prevalencia de la enfermedad en Chile, junto al creciente envejecimiento de la población, se esperaría que, a largo plazo, exista un aumento progresivo de los casos de pacientes que padezcan la EP, por

lo que es necesario buscar moléculas que tengan la capacidad de interferir en el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, dada la importancia que presenta este mecanismo en la patogenia en la EP.

En la presente Unidad de Investigación realizada en el segundo semestre del año 2016, desarrollada en los laboratorios de Ciencias Aplicadas a Tecnología Médica (CATEM) de la Universidad Andrés Bello, se realizó la evaluación de la capacidad inhibitoria que presentaban ciertos polifenoles, frente al proceso de agregación que sufre la  $\alpha$ -sinucleína, utilizando un ensayo de agregación *in vitro* con  $\alpha$ -sinucleína recombinante obtenida a partir de cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y purificada mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Las moléculas probadas provenían de una planta llamada *Rosmarinus officinalis*, conocida comúnmente como Romero, siendo utilizada por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El proceso de agregación fue monitoreado mediante tioflavina-T (ThT), siendo separadas las estructuras proteicas formadas durante el ensayo por medio de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

## CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 $\alpha$ -sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína fue descrita por primera vez en el año 1988 por Maroteaux et al. como una proteína específica de las neuronas, localizada en terminales presinápticos y en el *núcleo*, siendo catalogada después como parte de la familia de las sinucleínas [13].

#### 2.1.1 Estructura

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína presináptica soluble de 140 aminoácidos, con un peso molecular de 14,5 kDa [14] y un pKa de 4,7 [5]. Esta codificada por un único gen llamado *SNCA*, que posee siete exones localizados en el cromosoma 4 [15].

Estructuralmente, la proteína puede dividirse en tres regiones (Figura 1 y 2) con diferentes propiedades y funciones cada una de ellas, además de poseer dos residuos de fenilalanina (*Phe*) y cuatro de tirosina (*Tyr*), sin embargo, no posee residuos de triptófano (*Trp*):

- i. La región anfipática amino terminal (N-terminal) con los residuos desde 1 a 60 [15], con un rol crucial en la modulación de las interacciones con membranas [5], así como también, un motivo hexamérico conservado (KTKEGV), similar al dominio  $\alpha$ -helicoidal presente en la unión con membranas lipídicas [15,16]. Presenta dentro de su estructura, dos aminoácidos aromáticos: Phe4 y Tyr39 [3].

- ii. La región hidrofóbica central con los residuos de 61 a 95, también conocida como NAC (*non-Abetacomponent of alzheimer amyloid*), contiene tres motivos conservados (KTKEGV) [5,15]. Se cree que es la región responsable de la agregación proteica [16], debido a que la delección *in vitro* de la secuencia que posee este motivo, provocaría la disminución de la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína y la formación de fibrillas [5]. Posee un aminoácido aromático: Phe94 [3]
- iii. La región carboxilo terminal (C-terminal) con los residuos de 96 a 140 [15], se encuentra implicada en la regulación de la localización nuclear, así como la interacción con metales, moléculas pequeñas y algunas proteínas [5]. Por otro, está altamente enriquecida en residuos ácidos y prolinas [15], lo que impide su unión con lípidos [16]. Posee tres aminoácidos aromáticos: Tyr125, Tyr133, Tyr136, y no posee residuos de Trp [3].

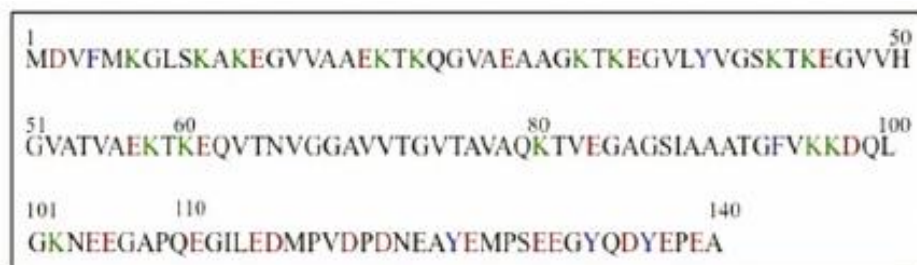


Figura 1 Secuencia aminoacídica de la  $\alpha$ -sinucleína.

En la figura se observan los aminoácidos aromáticos de color azul, los ácidos de color rojo y las lisinas de color verde [3]

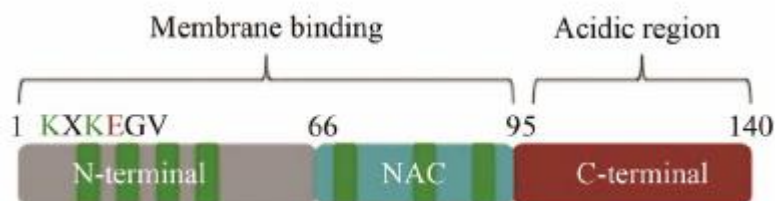


Figura 2 Esquema de las tres regiones de la  $\alpha$ -sinucleína [3]

Con respecto a su estructura primaria, la  $\alpha$ -sinucleína en soluciones acuosas, presenta conformación random coil [17], sin embargo, al estar en presencia de fosfolípidos con carga negativa, aproximadamente los primeros 100 aminoácidos de la proteína, presentes en la región N-terminal, tienden a facilitar la unión con lípidos, adoptando una conformación  $\alpha$ -helicoidal [3,16]. Aparentemente, las propiedades multifuncionales que posee la  $\alpha$ -sinucleína, le otorgan la capacidad de adoptar diferentes conformaciones al interactuar con membranas biológicas o de diferente composición, con proteínas o complejos proteicos [3,5,14,18], generando diferentes estados conformacionales destacando:

- a. Estado intrínseco de la  $\alpha$ -sinucleína en condiciones *in vitro* e *in vivo* [19].
- b. Estado de glóbulo pre-unido en condiciones de bajo pH, altas temperaturas [38], baja concentración de solventes orgánicos, iones metálicos, pesticidas, heparinas, siendo el resultado de la oligomerización espontánea *in vitro* e *in vivo* [19].
- c. Conformación  $\alpha$ -hélice unida a membranas biológicas o sintéticas [14,19].
- d. Conformación  $\alpha$ -hélice y hoja- $\beta$  en presencia de solventes orgánicos, en largos periodos de incubación favorece la aparición de agregados amorfos [19].
- e. Dímeros: formados durante largos periodos de incubación, previo a la formación de oligómeros y agregados [19].
- f. Oligómeros: formados a partir de uniones covalentes y no-covalentes de los dímeros, generando especies oligoméricas con diferentes morfologías [19]. Por otra parte, la adición de metales como Cu, Fe, Ni, Mg, Zn [41,44], favorece la oligomerización, generando oligómeros de tipo esféricos [19].
- g. Finalmente se observan los agregados insolubles los cuales poseen dos tipos de morfología: agregados amorfos en soluciones con altas concentraciones de alcohol, o bien, fibrillas tipo amiloide ricas en hoja- $\beta$  [15], presentes mayoritariamente en la fase final del proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína [32-33].

### 2.1.2 Función fisiológica

La  $\alpha$ -sinucleína se ubica en los terminales presinápticos de las neuronas dopaminérgicas [5], estimándose que corresponde a un 1% de las proteínas solubles citoplasmáticas, localizadas a nivel cerebral [15]. Con respecto a sus funciones, estas se relacionan con la liberación y transporte de vesículas sinápticas, unión entre ácidos grasos, y la regulación de enzimas, transportadores y vesículas que contienen neurotransmisores [15]. Además, se describe su participación en la plasticidad sináptica y el aprendizaje [14].

Por otro lado, la  $\alpha$ -sinucleína se encuentra interactuando con las membranas celulares en su conformación de  $\alpha$ -hélice [3], modificando su estructura de acuerdo con el tipo de membrana con la que se encuentra relacionada [14]. A su vez, presenta interacciones con diversas proteínas encargadas de la exocitosis, siendo alguna de ellas la fosfolipasa D2 y las GTPasas [5]. Numerosos estudios han señalado la presencia de la  $\alpha$ -sinucleína en complejos proteicos presinápticos llamados SNARE (*Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein (SNAP) receptor*) [5,14], controlando la degradación, ensamblaje, mantenimiento y distribución de neurotransmisores, incluida la dopamina (Figura 3) [20]. La proteína SNARE se encuentra relacionada con vías endocíticas [5,21] y junto a la  $\alpha$ -sinucleína, posee mayor eficiencia para la exocitosis de vesículas sinápticas [14].

Es importante considerar que, de manera fisiológica, la  $\alpha$ -sinucleína se encuentra en conformación  $\alpha$ -hélice unida a membranas, formando oligómeros estables, existiendo en equilibrio entre sus diferentes estados conformacionales, junto a los oligoméricos. Sin embargo, diversos factores como el estrés oxidativo, modificaciones post-traduccionales, proteólisis y las concentraciones de ácidos grasos, fosfolípidos y metales, inducirían o modularían, la estructura y

oligomerización *in vitro*, influyendo en el equilibrio entre monómeros y oligómeros *in vivo* [5,19].

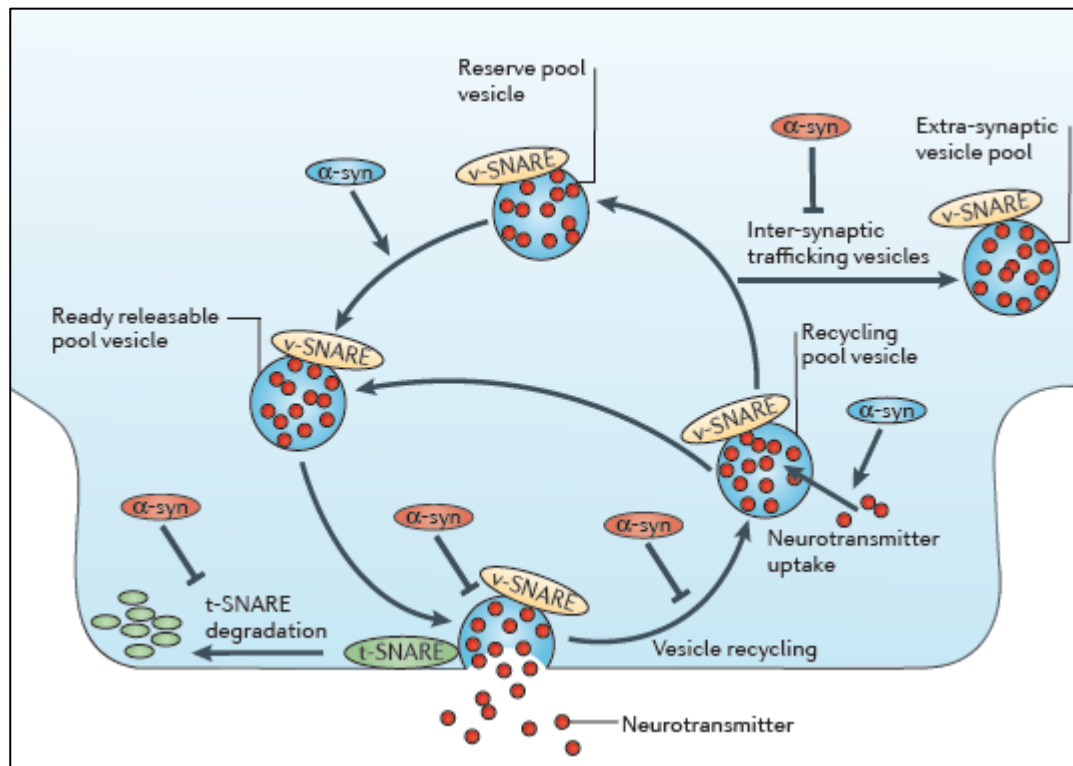


Figura 3 Funciones fisiológicas de la  $\alpha$ -sinucleína.

Se describen los roles de la  $\alpha$ -sinucleína (color azul) en el terminal presináptico, específicamente en la regulación del tráfico y liberación de vesículas que contienen neurotransmisores, así como la interacción entre las proteínas SNARE asociadas a membranas (t-SNARE) (color verde), como a vesículas (v-SNARE) (color naranja). La  $\alpha$ -sinucleína de color rojo, describe la participación en el reciclaje de vesículas, y la promoción de estabilidad entre los terminales sinápticos y los complejos t-SNARE.

### 2.1.3 Agregación proteica

En la patogenia de la EP, se describe la presencia de depósitos insolubles de agregados eosinofílicos en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas (figura 4), ubicadas en la sustancia nigra pars compacta, llamadas cuerpos de Lewy (CL) y neuritas de Lewy (NL), siendo la  $\alpha$ -sinucleína, el componente principal de dichos agregados [1,23]. En dicho lugar, se produce la mayor pérdida de células

nerviosas, generando la disminución de la dopamina y el aumento de las alteraciones motoras, sin embargo, dicha pérdida no está asociada solamente a dicha región, ya que se presentan ambas inclusiones en el núcleo motor del nervio vago, hipotálamo, núcleo basal de Meynert, locus ceruleus, corteza cerebral, bulbo olfatorio y en el sistema nervioso autónomo [1,24].

A su vez, tanto los CL como las NL, constituyen las características neuropatológicas de la demencia por cuerpos de Lewy (DCL), existiendo solamente ella, o en conjunto con otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [5].

Los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en el sistema nervioso central, depende del balance entre los niveles de síntesis, agregación y clearance [25]; un desbalance entre los mecanismos mencionados causaría una disfunción en una o más vías involucradas, favoreciendo la formación y acumulación de especies oligoméricas y fibrilares.

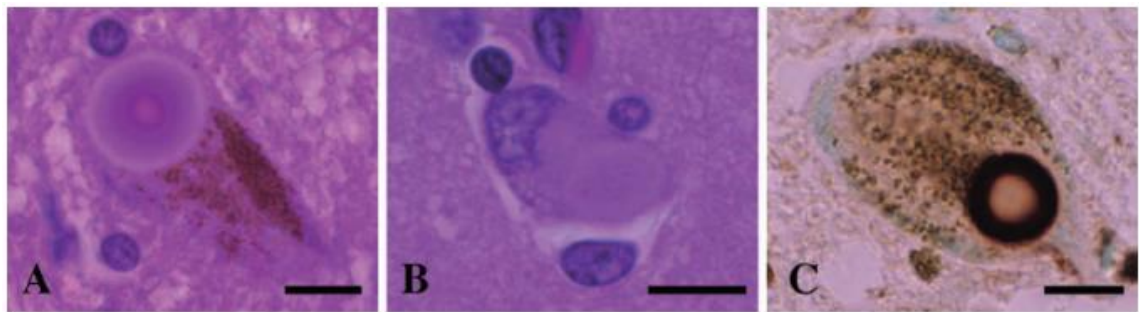


Figura 4 CL y NL en pacientes con EP (A y B) y DCL (C).

En la figura se observa: (A) CL concéntrico en una neurona pigmentada en la sustancia nigra. (B) CL cortical presente en la corteza temporal, teñido con hematoxilina y eosina. (C) CL presente en una neurona pigmentada en la sustancia nigra, teñido con anti  $\alpha$ -sinucleína [26].

#### 2.1.3.1 Mutaciones genéticas

Por otro lado, tanto la EP, como la DCL presentan una acumulación y distribución de  $\alpha$ -sinucleína en diferentes regiones cerebrales, sin embargo,



algunas formas familiares del Parkinson, presentan mutaciones en el gen *SNCA* resultando en el aumento de la expresión de  $\alpha$ -sinucleína; las mutaciones puntuales son *A53T*, *A30P* y *E46K*, las que favorecen la oligomerización de la proteína además de la formación de fibrillas [1,11,27], sin embargo, solo dos de ellas (*E46K* y *A53T*) realizan fibrilación *in vitro* e *in vivo*, ya que la mutación *A30P* está relacionada con la fibrilación de  $\alpha$ -sinucleína *in vivo*, presentándose mayoritariamente en los CL [5]. Dichas mutaciones favorecerían el aumento de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, debido al incremento en el nivel crítico requerido para iniciar la polimerización de la proteína [11]. Un polimorfismo presente en la región promotora del gen *SNCA* llamado Rep1, favorece el aumento de la expresión de  $\alpha$ -sinucleína [28].

En el año 1997, se identificaron dos loci asociados a los CL llamados: *PARK3* presente en el cromosoma 2p13 [29] y el *PARK4* ubicado en el cromosoma 4p15 [30]. Este último generalmente se encuentra en la DCL, presentándose mayoritariamente en las células gliales [1]. En el año 1998, se descubrió una nueva mutación llamada *PARK2*, la cual fue identificada como la causa genética del parkinsonismo juvenil autosómico-recesivo [27,31].

#### 2.1.3.2 Formación y estructura de los agregados proteicos

Diversos estudios señalan que el proceso de agregación posee un mecanismo dependiente de nucleación y polimerización, terminando en la formación de fibras amiloides [32,33]. La fase inicial se denomina fase de retardo (*lag-phase*) caracterizada por iniciar con una nucleación, luego con una fase exponencial, seguido de la etapa de crecimiento y propagación de intermediarios, terminando en una fase estacionaria (figura 5) [33]. Dicho proceso de agregación depende de la estructura que posea la  $\alpha$ -sinucleína, así como también, los factores externos que estén involucrados en la formación de los agregados, por ejemplo: pH, temperatura, concentración de iones metálicos, agentes pesticidas [5, 33].

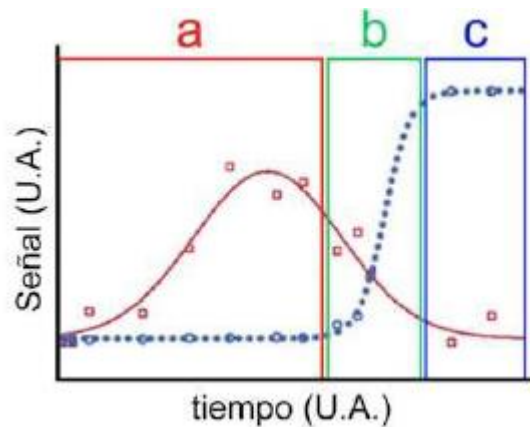


Figura 5 Representación del proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína.

La curva azul representa la formación de fibras amiloideas, además se describen tres etapas: (a) fase de retardo, (b) fase de crecimiento exponencial y (c) fase estacionaria de equilibrio entre fibras maduras y monómeros.

En condiciones adecuadas, la  $\alpha$ -sinucleína puede formar agregados morfológicamente diferentes como oligómeros, agregados solubles, oligómeros unidos por enlaces de tirosina, además de agregados insolubles amorfos y fibrilares amiloideos [32].

Particularmente, el proceso de agregación comienza con monómeros no unidos que comienzan a interaccionar con dímeros inestables presentes en el citoplasma neuronal, generando lentamente variaciones morfológicas en los oligómeros preformados, incluyendo formas esféricas o en forma de anillo, los cuales generarán posteriormente fibrillas. Los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína se convierten en fibrillas gracias a la adición de monómeros, mediante mecanismos de polimerización (Figura 6) [5]. Es importante considerar que, durante el proceso de agregación, la  $\alpha$ -sinucleína sufre un cambio conformacional desde su forma nativa  $\alpha$ -hélice, presente en membranas celulares, a hoja- $\beta$ , presente principalmente en fibras amiloides [15], siendo la estructura principal de los CL [1,5,22], los cuales corresponden a los marcadores histopatológicos de la EP [3,5].

En la DCL, se evidencia diferentes conformaciones estructurales de agregados proteicos, incluyendo oligómeros, protofibrillas y fibrillas, siendo estas últimas detectadas en los CL, específicamente en los somas neuronales [4,5,22], a diferencia de los agregados oligoméricos, que se encuentran localizados en los axones y terminales presinápticos [5], predominando las NL [4]. Diversos reportes describen la presencia de elevados niveles de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína en pacientes post-mortem con DCL [33].

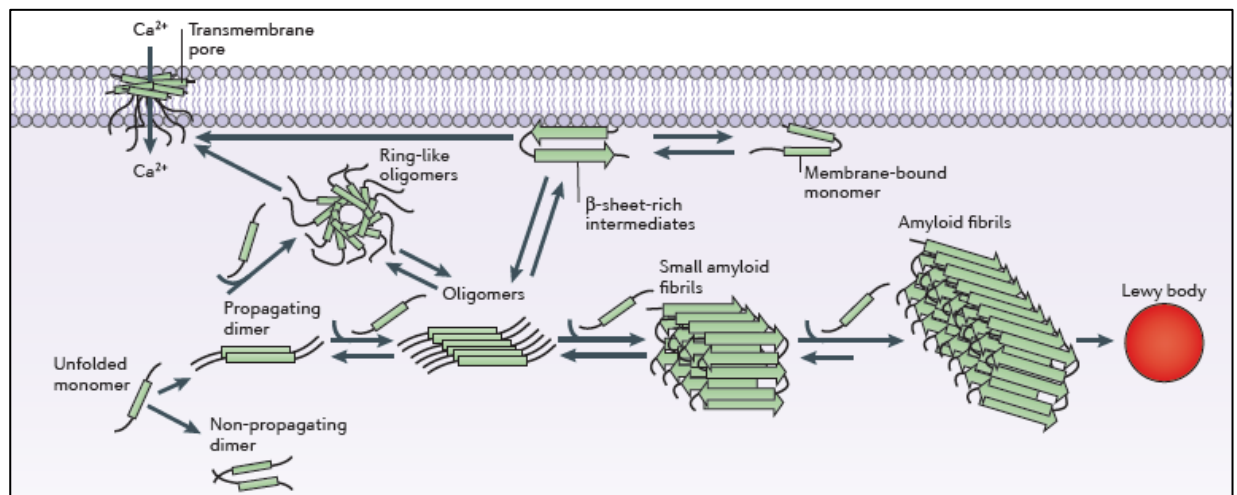


Figura 6 Mecanismo de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína [5].

### 2.1.3.3 Agregación *in vitro* de $\alpha$ -sinucleína

El proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína posee un rol crucial en la patogenia de la EP, constituyendo los ensayos *in vitro* de agregación, una herramienta importante para el estudio de los mecanismos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, los ensayos *in vitro* permiten llevar a cabo la búsqueda de nuevas moléculas capaces de interferir en la formación de fibrillas, ayudándonos a comprender el mecanismo donde cambia estructuralmente la  $\alpha$ -sinucleína, pasando desde ser soluble a formar fibrillas de hoja- $\beta$  insolubles, además de establecer las bases para el desarrollo de nuevas terapias a las que actualmente existen para el tratamiento de la EP [34].

En primera instancia, es importante considerar que es necesaria la presencia de concentraciones de proteína altamente puras, utilizando comúnmente 0,5 a 1 mg/mL (35-70  $\mu$ M) para llevar a cabo los ensayos de fibrilización [34]. A su vez, otros estudios sugieren la utilización de concentraciones más altas, comprendidas entre 5 a 7 mg/mL [35], sin embargo, la mínima concentración para la realización de los ensayos es de 2 mg/mL, cual corresponde aproximadamente a 14  $\mu$ M [36]. Por otra parte, se ha reportado que un aumento significativo en la concentración, cercano a los 8.2 mg/mL, disminuiría la fase inicial o *lag-phase*, del proceso de fibrilización [33,34].

Uno de los factores más importantes a considerar para llevar a cabo los ensayos de agregación, corresponde a la agitación, debido a su impacto en la cinética del proceso de fibrilización [34]. Diversos reportes señalan que a medida que aumenta la velocidad de agitación, mayor es la colisión entre las especies oligoméricas y monoméricas, lo que aumentaría la interacción con las fibras ya formadas [37]. Un estudio realizado por Uversky, señala que la agitación es uno de los mayores determinantes de la fibrilización de la  $\alpha$ -sinucleína [38].

Es fundamental la reproducibilidad de los ensayos *in vitro*, por lo que hay que considerar los factores externos al ensayo. En la literatura, Giehm y sus colaboradores, señalan que existen factores exógenos que pueden modular e interactuar directamente en el proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína, considerando la relevancia de la temperatura, el pH y la fuerza iónica [39]. Particularmente, una disminución del pH o un aumento de la temperatura, afectaría acelerando la cinética de la agregación, y por consecuencia la fase de retardo o *lag-phase* [38]. Por otro lado, una elevación de la temperatura favorecería la formación de interacciones hidrofóbicas fuertes, causando la disminución del pH y la carga neta de la proteína, contribuyendo a la aparición de intermediarios parcialmente formados de  $\alpha$ -sinucleína [34]. Con respecto al efecto de la fuerza iónica en la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, esta se ve involucrada

en el aumento de los niveles de fibrilización correlacionándose con el aumento progresivo de las sales utilizadas, considerando como máxima concentración 300 mM NaCl [40]

Diversos estudios señalan la importancia que poseen los metales debido a la influencia que ejercen en la formación de fibrillas [15]. Particularmente, los iones metálicos participan estimulando los cambios conformacionales de la proteína, así como también, el desarrollo de especies intermediarias, precursoras de las fibrillas [5]. Por otro lado, se describe el efecto que posee la exposición constante a metales, siendo un factor de riesgo para el desarrollo de la EP; especies como el manganeso, hierro, aluminio, zinc y cobre, estarían involucrados en la patogénesis de la enfermedad [41].

#### *2.1.3.4 Toxicidad de los agregados proteicos en las neuronas*

El proceso de agregación patológica de  $\alpha$ -sinucleína, finaliza con la presencia de diversas especies oligoméricas ricas en hoja- $\beta$  de diferentes tamaños con la capacidad de inducir tanto la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, como toxicidad a nivel neuronal [5]. Numerosos estudios reportan que las formas amiloidogénicas de bajo peso molecular son las responsables de la neurotoxicidad y progresión de la enfermedad [42], específicamente los oligómeros pre fibrilares y las protofibrillas [34,43,44].

Por otro lado, diversos factores tanto internos como externos, influirían en la permeabilización de membranas celulares, favoreciendo el estrés oxidativo celular, debido a que las especies oligoméricas tendrían la capacidad de aumentar la permeabilidad de la bicapa lipídica por medio de la formación de poros [3,5], aumentando  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y disminuyendo los niveles de proteínas sinápticas, aumentando los niveles de especies reactivas de oxígeno, desencadenando la muerte celular [5,45]. Bajo condiciones *in vitro*, el aumento de la concentración de  $\alpha$ -sinucleína [33,34], los largos periodos de incubación a

37°C, la adición de metales específicos como  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  [5,15,41,44], la nitratación o la aplicación de dopamina induciría la formación de fibrillas [5].

Diversos estudios han señalado la participación de las mutaciones A53T y A30P, como las responsables de la disminución de la función mitocondrial, producto del aumento de las especies oxidativas al interior de la célula [43], a causa del cambio en la morfología celular, producto de la interacción entre los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína y el complejo I de la mitocondria, el cual está asociado con la mitofagia (función celular relacionada con la autoeliminación de mitocondrias dañadas) [46].

Bajo condiciones fisiológicas, se ha considerado que la  $\alpha$ -sinucleína solo está presente intracelularmente, asociada a vesículas [15], sin embargo, recientemente se ha sugerido que, bajo ciertas circunstancias, los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína son eliminados desde la neurona por mecanismos secretores inusuales [47], observándose la presencia de inclusiones de fibras amiloides en otras regiones cerebrales (figura 7) [48]. Tanto la presencia de fallas en los sistemas de control del ambiente neuronal como chaperonas, proteosomas de ubiquitina y los fagosomas-lisosomas, además de las vías de eliminación intracelular, como la autofagia, contribuirían a la liberación de  $\alpha$ -sinucleína desde la neurona, provocando la aparición de inclusiones citoplasmáticas en otras regiones cerebrales (figura 8) [6,24]. Este proceso se iniciaría con la fase de nucleación involucrada en el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, para luego continuar con el desarrollo del oligómero, gracias a la adición de monómeros a la fibra preformada [5,33]; los mecanismos involucrados en la propagación de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína son: exocitosis [49], liberación exosomal [47] y penetración directa [50], transmisión trans-sináptica o por receptores de membrana [5]. Diversos estudios *in vivo* realizados en cultivos celulares han descrito la aparición de CL en las células aledañas al sitio de adición de  $\alpha$ -sinucleína recombinante [51].

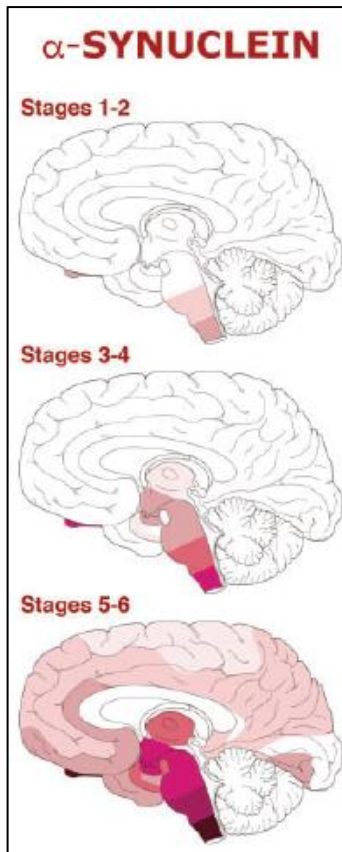


Figura 7 Presencia de  $\alpha$ -sinucleína en otras regiones cerebrales.

En la figura se describe el avance de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína en otras regiones cerebrales, observándose diferentes etapas: (Etapas 1-2) presencia en bulbo olfatorio y en el núcleo motor dorsal del vago y el nervio glossofaríngeo. (Etapas 3-4) desde el tronco encefálico, asciende la patológica a través de la protuberancia hasta el cerebro medio. (Etapas 5-6) ascenso final hasta el Neocórtex [48].

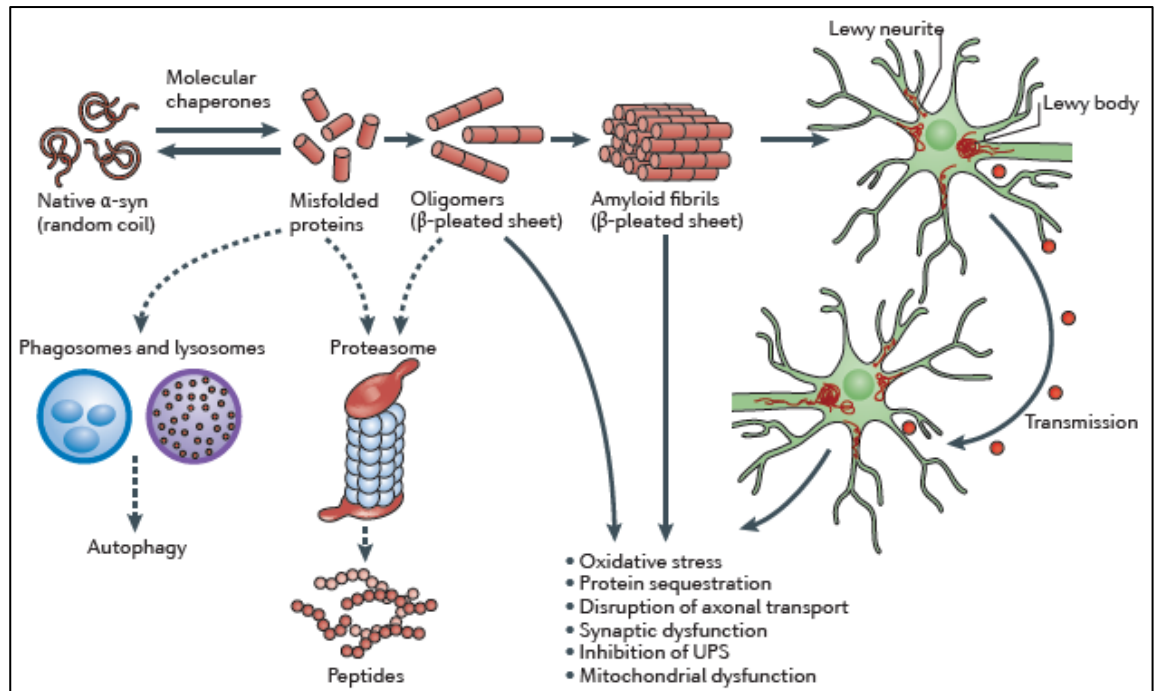


Figura 8 Modelo que explica la toxicidad y propagación de la  $\alpha$ -sinucleína.

Fisiológicamente, la  $\alpha$ -sinucleína posee una conformación random coil unida a membranas, sin embargo, bajo condiciones patológicas, cambia su conformación, generando especies neurotóxicas como los dímeros, trímeros, oligómeros, con capacidad de formar, luego de iniciar el proceso de agregación, especies intermedias, protofibrillas y finalmente fibras amiloides, siendo estos últimos, los componentes principales de los CL y NL [6].

## 2.2 Búsqueda de nuevas opciones al tratamiento actual de la EP

Debido al potencial neurotóxico que poseen cada una de las especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína formadas durante el proceso de agregación, han surgido diversas hipótesis con respecto a los posibles blancos terapéuticos que se podrían abordar a fin de lograr la disminución de los niveles intracelular como extracelular de  $\alpha$ -sinucleína. Algunos de ellos están relacionados con la reducción de la expresión de la proteína al silenciar el gen o el promotor del gen *SNCA* con microRNA, además de promover la unión con moléculas de tipo chaperonas, favoreciendo la estabilización del estado nativo de la  $\alpha$ -sinucleína [5].



En la actualidad, el tratamiento actual de la EP es la levodopa, debido a que la dopamina no puede atravesar la barrera hematoencefálica, y el fármaco lo hace mediante transporte facilitado., para luego ser convertida mediante la descarboxilasa de la dopamina, en dopamina a nivel cerebral, estimulando los receptores dopaminérgicos tipo 1 y tipo 2, estos últimos, estarían asociados a complicaciones motoras [9]. Dada la progresión de la EP, los pacientes presentan diversas complicaciones psiquiátricas como problemas en el aprendizaje y trastornos conductuales [6], sin embargo, el 40% experimenta alteraciones motoras, denominadas fenómenos *on-off* [27,52]. Los fenómenos *on* se refieren a la respuesta adecuada al tratamiento farmacológico, experimentando mejoría clínica, y los fenómenos *off* cuando la duración de la respuesta disminuye, y la sintomatológica parkinsoniana aumenta [52].

Es por esto, que actualmente la búsqueda de moléculas constituye un campo de investigación mucho más amplio y con más beneficios para el paciente, debido a que las moléculas que han reportado actividad antioxidante y protectora para el sistema nervioso central se encuentran en diversos alimentos y plantas, por lo que estimular el consumo de dichos alimentos, influiría directamente en el avance de diversas enfermedades neurodegenerativas. Diversos estudios señalan que moléculas clasificadas como polifenoles, que en su estructura química poseen un grupo catecol con un grupo hidroxilo (OH) en posición 3,4-*ortho*, poseerían la capacidad de disminuir especies oxidativas como los radicales libres, provocando un efecto antioxidante y cito-protector significativo, además de antialérgico, antiviral y antiinflamatorio [53,54].

La dopamina, que es un catecol oxidado fisiológicamente, posee una especie reactiva *ortho*-quinona (*o*-quinona), que posee la capacidad de formar enlaces covalentes con cisteínas (aminoácido que posee la  $\alpha$ -sinucleína) y otros residuos nucleofílicos [5]. Por otra parte, diversos ensayos *in vitro* han demostrado la capacidad que poseen los catecoles oxidados de inhibir la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, debido a que logran estabilizar los oligómeros

intermediarios, sin embargo, en ausencia de ellos, como sucede en la patogenia de la EP donde se pierden neuronas dopaminérgicas [3,19], aumentarían los niveles de especies oligoméricas de mayor tamaño como las prefibrillas, favoreciendo la formación de la fibra amiloide [11,12].

Con respecto a los extractos evaluados en los ensayos de agregación, estos provienen del *Rosmarinus officinalis*, conocido también como Romero, una planta del mediterráneo descrita por la presencia de compuestos dentro de su estructura química, con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, llamados polifenoles [55], los cuales constituyen un blanco ideal para la búsqueda de moléculas que puedan participar en el proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína. Particularmente, la actividad de los extractos se debe a la presencia del ácido caféico y rosmarínico [56].

### **2.2.1 Estudios previos con moléculas antioxidantes**

En la actualidad, la búsqueda de nuevas moléculas que participen en la inhibición del proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, constituye un campo aun no explorado en su totalidad, debido al gran número de alimentos que poseen propiedades antioxidantes naturales debido a la presencia de polifenoles presentes en su estructura química, sea el caso por ejemplo del té, el vino, los chocolates, las frutas y vegetales, beneficiando en la disminución del riesgo de las enfermedades crónicas y el avance de las enfermedades neurodegenerativas [56-57]. En el año 2014, Lorenzen describió el potente efecto inhibitorio de un polifenol presente en el té verde, describiendo su modelo de actividad de dos maneras: en primer lugar, actuaría directamente sobre el proceso de agregación, generando especies monoméricas de  $\alpha$ -sinucleína, reestructurando los oligómeros y, por otra parte, remodelando las fibras de  $\alpha$ -sinucleína, generando especies no tóxicas celularmente [58].

## 2.3 Técnicas de monitoreo de agregación

### 2.3.1 ThT

En el año 1959, Vassar y Culling demostraron el potencial que poseía la fluorescencia en el diagnóstico de fibras amiloides, describiendo el uso de la solución benzatiol ThT, como un potente marcador en histología, debido a su emisión de fluorescencia selectiva, al unirse a la hoja- $\beta$  presente en las fibras amiloides, permitiéndonos monitorear la cinética del proceso de fibrilación *in vitro* [34,59]. En la actualidad, el ThT es el marcador más utilizado en los ensayos *in vitro* para demostrar la actividad inhibitoria de moléculas en enfermedades relacionadas con la formación de fibras amiloides como la enfermedad de Alzheimer, la EP y la amiloidosis [60].

En la EP, la fibra amiloide se forma gracias al cambio conformacional que sufre la  $\alpha$ -sinucleína, desde  $\alpha$ -hélice a hoja- $\beta$ , generando un modelo de canal formado por diversas capas de láminas de hoja- $\beta$ , exhibiendo sitios de unión al ThT, debido a la especificidad del marcador fluorescente por dichas estructuras (figura 9). Al estar unido a fibras amiloides, el ThT presenta una excitación máxima entre 385 nm a 450 nm y una emisión máxima entre 445 nm y 482 nm [33,59].

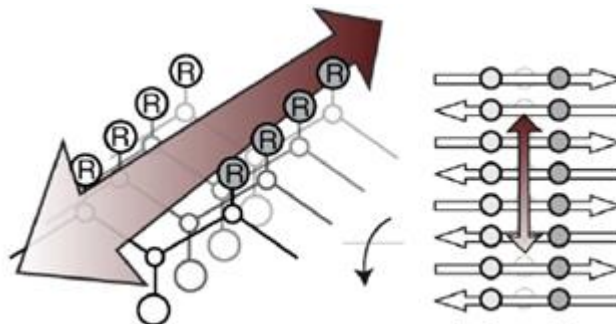


Figura 9 Modelo de canal de la fibra amiloide, además de la unión del ThT a los sitios de unión [59].

### 2.3.1.1 Fluorescencia en el estudio de proteínas

La fluorescencia es un fenómeno molecular basado en la capacidad de una sustancia de absorber luz y luego irradiar parte de ella mediante la emisión de otro color, conociéndose dicho proceso como excitación y emisión [59]. Para la evaluación de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, se utiliza la fluorescencia intrínseca generada por los aminoácidos aromáticos Phe y Tyr, sin embargo, Tyr exhibe un mayor cambio en el espectro de emisión desde 305 a 340 nm, siendo insensible a la polaridad del solvente [3,61], permitiendo monitorear el proceso de fibrilación, tanto en ensayos de agregación *in vitro*, como en la interacción de la  $\alpha$ -sinucleína con las vesículas lipídicas [3].

## 2.4 Técnicas de purificación y separación de proteínas

Una de las formas ideales para obtención de proteína recombinante es a partir de cultivos celulares, utilizando modelos bacterianos con capacidad de producir grandes cantidades de proteína recombinante, como lo es la *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) [62]. Sin embargo, es necesario la utilización de metodologías que permitan separar la proteína recombinante del resto de las proteínas bacterianas, posterior a la fase de inducción de la proteína, así como la purificación de la proteína gracias a la presencia de regiones aminoacídica, permitiendo una elusión específica del analito.

### 2.4.1 Cromatografía de afinidad a metales (IMAC)

Definida en inglés como *Immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC), es un tipo de cromatografía, basada en la interacción de un metal contenido en una matriz -fase inmóvil-, con una secuencia de aminoácidos específica [62]. Existen diferentes tipos de metales presentes en la matriz como por ejemplo  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  [63], además de ser necesario una fase móvil capaz de eluir la

proteína retenida en la columna, por lo que para la cromatografía de tipo IMAC, se utiliza Imidazol, el cual es un análogo de la histidina, que actúa competitivamente sobre las uniones de la cadena de histidinas sobre la fase inmóvil [62,64]. Particularmente el metal presente en la matriz participa como un grupo dador de electrones en los anillos imidazólicos de las histidinas, formando enlaces de coordinación con la proteína, permitiendo la retención y elusión mediada por buffers [62,65].

#### **2.4.2 Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)**

Definida en inglés como *Size-exclusion chromatography* (SEC), es un tipo de cromatografía basada en el principio de la separación de analitos en base a su tamaño, manteniendo su capacidad biológica [63], y utilizando una curva de calibración, derivada de una serie de analitos con tamaños conocidos, para estimar el que posee el analito desconocido [66]. La separación se lleva a cabo gracias a la presencia de poros en el gel contenido en la matriz, capaz de separar las proteínas o péptidos en base a su tamaño; en la actualidad se utiliza poros de sílice capaces de aumentar el rendimiento en la separación de partículas de bajo tamaño molecular [66]. Para realizar la detección de los analitos, se utilizan longitudes de onda del espectro UV, siendo 210, 214 y 220 nm las más utilizadas. A su vez, se utiliza una longitud de onda cercana a 280 nm para la detección de aminoácidos como Tyr y Trp, debido a su sensibilidad analítica para realizar la lectura de sus absorbancias [67]

## **CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1 Hipótesis**

“Diversos compuestos de origen natural aislados de *Rosmarinus officinalis*, inhiben el proceso de agregación en un modelo *in vitro* de sinucleína”

### **3.2 Objetivos**

#### **3.2.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto inhibitorio de diferentes polifenoles, frente al proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína.

#### **3.2.2 Objetivos específicos**

- Comparar la capacidad inhibitoria de una serie de moléculas frente al proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína.
- Cuantificar el nivel de inhibición de la agregación de los diferentes extractos naturales, sobre el proceso de agregación.
- Realizar la determinación del IC<sub>50</sub>, a partir de la molécula que presentó mayor porcentaje inhibitorio.
- Caracterizar mediante SEC los diferentes tipos estructurales de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de compuestos naturales de origen natural.

## CAPÍTULO 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Biológico

- Cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3)

#### 4.1.2 Reactivos y soluciones

##### 4.1.2.1 Clonamiento de $\alpha$ -sinucleína

- Kit de extracción DNA GenElute™ Plasmid Miniprep Kit SIGMA®

##### 4.1.2.2 Generación de células competentes

##### Solución:

- Amortiguador de células competentes (SCC): 100 mM KCl, 50 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 10% glicerol y 10 mM acetato de sodio, pH 6.2

##### 4.1.2.3 Cultivo bacteriano

##### Reactivos:

- Stock de Kanamicina 10 mM/mL
- Stock de Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 M
- Stock de Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM

##### Soluciones:

- Medio Luria-Bertani (LB) (Sigma®) para cultivo en matraz
- Medio LB más base Agar Nutritivo (AN) para cultivo en placas

#### 4.1.2.4 Purificación de $\alpha$ -sinucleína mediante HPLC

##### Materiales:

- Columna ProPac™ IMAC-10 Thermo Scientific®
- Filtro MS ® PP Syringe de 25 mm y poros de 0.22  $\mu$ m
- Jeringa Microliter™ #710 de 100  $\mu$ L Hamilton®

##### Soluciones:

- 20 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de HEPES
- 500 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de HEPES
- HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

#### 4.1.2.5 Diálisis y concentración de $\alpha$ -sinucleína

##### Materiales:

- SnakeSkin® Dialysis Tubing 10 K MWCO, 16 mm dry I.D. 10,6 metros Thermo Scientific.
- SnakeSkin® Dialysis Tubing Clips Thermo Scientific.
- Filtro concentrador Millipore® Amicon® Ultra-4 de 15 mL

##### Solución:

- Buffer fosfato-salino 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### 4.1.2.6 SDS-PAGE

##### Reactivos:

- 4x Tris Cl/SDS pH 8.8
- 4x Tris Cl/SDS pH 6.8
- Persulfato de amonio 0.1 mg/mL
- Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad®)



- TEMED (Bio-Rad®)
- Marcador de proteínas PageRuler Plus #26619 (Thermo Scientific®)
- Alcohol isopropílico

#### Soluciones:

- Solución 30% Acrilamida, 0,8% Bis-acrilamida
- Solución stock de Azul de Coomassie (0.1% p/v Azul de Coomassie G250, 2% p/v ácido orto-fosfórico, 10% p/v sulfato de amonio)
- Solución de trabajo: 80% v/v de la solución stock de Azul de Coomassie, 20% v/v metanol.
- Solución de fijación: 40% v/v etanol, 10% v/v ácido acético
- Solución de lavado: 20% v/v metanol, 15% v/v ácido acético

#### *4.1.2.7 Ensayos in vitro de $\alpha$ -sinucleína*

#### Reactivos:

- ThT 50  $\mu$ M
- DMSO (dimetilsulfóxido)

#### Soluciones:

- Diluciones de las moléculas MLC1, MLC2, MLC3, MLC4, MLC5 con las siguientes concentraciones: 10 mM, 7,5 mM, 5,0 mM, 2,5 mM, 1,0 mM

#### *4.1.2.8 Separación oligómeros de $\alpha$ -sinucleína mediante SEC*

#### Materiales:

- Columna BioSep SEC s2000®
- Jeringa Microliter™ #710 de 100  $\mu$ L Hamilton®

#### Solución:

- 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8

## **4.2 Equipos**

- Sonicador Ultrasonic Cleaner SB-100DT
- Centrifuga Hettich® Universal 320R
- Termoagitador en seco BOECO® MSH 130
- Espectrofotómetro Mindray® BA-88A
- Incubador Shaker Zhicheng® ZHWY 100 B
- HPLC Youngling YL9100 System
- Recolector Fraction Collector Gilson FC203B
- Cámara electroforética Mini-Protean® tetracell, 4-gel system (Bio-Rad®)
- Fluorímetro Synergy H1 BioTek®
- Phmetro digital Ohaus ® Starter 2100
- Refrigerador/Congelador: Daewoo® RF-42151
- Freezer Panasonic® MDF-U33U-PB
- Baño Termorregulado: Digisystem® DSB-500D
- Estufa de incubación Incucell MMM Group.
- Balanza analítica Adam ® AFA-120LC

## **4.3 Método**

### **4.3.1 Tipo de estudio y lugar de realización**

El trabajo corresponde a un estudio de tipo experimental, llevado a cabo en los laboratorios de Ciencias Aplicadas a Tecnología Médica (CATEM), ubicados en la Universidad Andrés Bello, sede República (República 252).

### **4.3.2 Clonamiento de $\alpha$ -sinucleína humana recombinante**

#### *4.3.2.1 Cepa y vector utilizado*

La transformación y producción *in vitro* de  $\alpha$ -sinucleína, se realizó a partir de una cepa de *E. coli* BL21 (DE3), previamente transformada con el plásmido pET-28a(+) (Novagen, USA) que incluye: una región T7 para la expresión de genes por medio de la T7 RNA Polimerasa, una región que codifica la resistencia a la kanamicina, y una secuencia de polihistidina (también llamada *Hys-tag*). En la figura 10 se visualiza el mapa genómico del vector utilizado.

#### *4.3.2.2 Amplificación por PCR*

Antes de iniciado el proceso de amplificación, los tubos donde se dispondrá la muestra fueron incubados a 95°C por 3 minutos, asegurando así la completa desnaturalización de las hebras de ADN. La amplificación se realizó por 30 ciclos de 93°C (0,5 minuto) para la desnaturalización, 1 minuto a 51°C para la hibridación y nuevamente 1 minuto a 72°C para la elongación de la hebra de ADN. Tras esto, el producto obtenido del PCR fue incorporado y clonado con el vector pET-28a(+).



La mezcla de la reacción incluye 10 pmol de cada cebador previamente mencionado, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 1,5 mM  $MgCl_2$ , y 2,5 unidades de Taq DNA Polymerase (GIBCO-BRL) en un volumen final de 50  $\mu$ L de “PCR buffer” (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl).

#### **4.3.3 Cultivo de células competentes**

Previo a la transformación de las células competentes (CC), fue necesaria la producción y cultivo de células que pudiesen incorporar en su interior el vector previamente clonado. Inicialmente, se descongeló un tubo eppendorf que contenía una cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y se extrajo 100  $\mu$ L que fueron resuspendidos en dos tubos falcon con 10 mL de medio LB cada uno, siendo incubados a 200 rpm por 18 horas a 37°C. Para la preparación del medio LB, se necesitó 15,5 g de medio LB resuspendido en 1 L de agua destilada, siendo posteriormente autoclavado a 121,5°C. Terminado el proceso, a 250 mL del medio LB se agregó 5,75 g de AN para la elaboración de las placas de siembra.

Al día siguiente, se adicionó 45  $\mu$ L de kanamicina 10 mg/mL, a fin de alcanzar una concentración de 30  $\mu$ g/mL en la placa y se realizó la siembra por agotamiento de estrías de ambos tubos; el volumen en placa es de 15 mL de medio LB más AN. Ambas placas fueron incubadas utilizando una atmósfera aeróbica por 18 horas a 37°C en la estufa de cultivo Incucell. Al día siguiente, se seleccionaron dos colonias aisladas, y se resuspendieron en 10 mL de medio LB cada una, para luego ser incubadas a 200 rpm por 18 horas a 37°C.

Terminado el tiempo de incubación, se realizó un nuevo cultivo en un matraz Erlenmeyer donde se agregó 90 mL de medio LB más los 10 mL de la suspensión bacteriana previamente incubada, manteniendo una relación 1:10. Además, se realizó la lectura de la absorbancia inicial en el Fluorímetro a una longitud de

onda de 640 nm, mientras era incubada a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,4 – 0,6. Tras alcanzar la DO, se centrifugó a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C, siendo resuspendido el pellet en 80 mL de la SCC, incubando en hielo por 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 3.500 rpm por 20 minutos a 4°C para la separación del pellet y sobrenadante, siendo descartado este último y resuspendido en 10 mL de la SCC el pellet obtenido.

Para ser almacenado el pellet, se realizaron alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf, utilizándose la relación 1:4, la que correspondió a 200 µL de glicerol 85% y 800 µL de la resuspensión del pellet, respectivamente, siendo almacenado a -80°C para su posterior transformación.

#### *4.3.3.1 Transformación de las CC*

Para realizar la transformación, se incubó 300 µL de CC recién descongeladas con 3 µL del DNA previamente clonado con el vector, en hielo por 30 minutos. Luego, se incubó por 30 segundos a 42°C, para nuevamente incubarlo en hielo por 30 minutos. Seguido de esto, se adicionó 1 mL de medio LB e incubó a 140 rpm por 1 hora a 37°C. Terminada la incubación, se centrifugó a 2.500 rpm por 5 minutos para obtención del pellet; el pellet obtenido fue sembrado posteriormente en placas con medio LB más AN y kanamicina 30 µg/mL, y se dejó incubando en atmósfera aeróbica por 18 horas a 37°C. Al día siguiente, se seleccionaron las colonias aisladas, y se comenzó el cultivo y producción de la proteína, debido a que las bacterias que pudieron incorporar el vector pudieron crecer en dicho medio con el antibiótico.

Desde las colonias aisladas, se realizó un cultivo “piloto” para verificar la incorporación del vector, en 10 mL de medio LB, añadiendo 30 µL de kanamicina 10 mg/mL, con el fin de alcanzar una concentración de 30 µg/mL en el cultivo, dejando en incubación a 200 rpm por 18 horas a 37°C. Al día siguiente, se

realizaron alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf, siguiendo la relación 1:4 antes descrita, siendo almacenados a -80°C para ser usados en los cultivos.

#### **4.3.4 Cultivo y producción de proteína recombinante**

Para la realización del cultivo se utilizó uno de los tubos eppendorf almacenado a -80°C previamente descongelado en hielo, y se tomó una alícuota de 100 µL para ser resuspendida en 80 mL de medio LB dispuesto en un matraz Erlenmeyer. Además, se añadió 240 µL de kanamicina 10 mg/mL, alcanzando una concentración en el medio de 30 µg/ml, para luego ser incubado a 200 rpm por 18 horas a 37°C.

Al día siguiente, se tomó el volumen total del cultivo realizado y se añadió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 320 mL de medio LB en su interior, dejando como volumen final 400 mL, y se dejó en incubación a 200 rpm a 37°C hasta alcanzar la DO ideal; la relación utilizada fue de 1:5, que corresponde al cultivo bacteriano y al medio LB, respectivamente. Además, se realizó una lectura de la absorbancia inicial en el Fluorímetro a una longitud de onda de 640 nm, repitiendo el procedimiento cada 20 minutos, hasta alcanzar una DO de 0,4 – 0,6 para comenzar la inducción de la proteína.

Luego de alcanzar la DO, y previo a iniciar la inducción con IPTG, se extrajo una alícuota de 1 mL desde el cultivo, y se almacenó en un tubo eppendorf a -20°C, con el propósito de cargar un control negativo al momento verificar la inducción, mediante una electroforesis. Para comenzar la inducción de la proteína, se añadió 400 µL de IPTG 1 M, con el fin de alcanzar una concentración final en el cultivo de 1 mM y se dejó incubando a 200 rpm por 3 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de inducción, se procedió a la centrifugación del cultivo en un tubo falcon de 50 mL a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C, descartando el

sobrenadante obtenido, para volver a cargar el tubo con 50 mL del cultivo. Se realizaron cuatro ciclos de centrifugación, la cual dejó en solo dos tubos falcon, dos pellets correspondientes al cultivo de 400 mL. Los pellets obtenidos fueron almacenados a -20°C, hasta su posterior uso.

#### **4.3.5 Separación y purificación proteica**

El pellet obtenido, fue resuspendido con 5 mL de la solución de imidazol 20 mM, 500 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, adicionando 100 µL de PMSF 100 mM, que corresponde a un inhibidor de proteasas [62], el cual tuvo una concentración final de 2 mM en la solución. A continuación, fue sometido a 3 ciclos que consistió cada uno en: sonicación por 5 minutos a 37°C y congelación por 5 minutos a -80°C; terminado el último ciclo, fue depositado el tubo falcon en el baño termostático por 5 minutos a 90°C, para luego ser centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido luego de la centrifugación fue pasado por un filtro MS de 0,22 µm, siendo almacenado a -80°C para su posterior purificación.

Para el proceso de purificación de  $\alpha$ -sinucleína, se utilizó la columna ProPac-IMAC, siendo optimizados los tiempos de retención y elución mediante HPLC; la cromatografía de tipo IMAC, consiste en la interacción entre un metal inmovilizado a una matriz, que en este caso es Cobalto, y una cadena específica de aminoácidos, que para el caso de la  $\alpha$ -sinucleína recombinante, es la cola de seis histidinas presentes en la región *Hys-tag* [62,63]. Para llevar a cabo la purificación, se utilizó un método de retención y elución, basado en la generación de un gradiente no isocrático mediante el uso de dos buffers: buffer A que posee imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, HEPES 20 mM, y el buffer B que posee imidazol 500 mM, NaCl 500 mM, HEPES 20 mM; ambas con pH 7.4. En la Tabla 1 se describe el detalle del gradiente utilizado.



Tabla 1 Protocolo para la generación del gradiente de concentración.

Tiempo (minutos)	Buffer A (%)	Buffer B (%)	Flujo (mL/min)
0	100	0	0,5
30	0	100	0,5
40	0	100	0,5

Para iniciar el método, se cargaron 500  $\mu$ L del sobrenadante con la jeringa Microliter™ en el *loop* de carga del HPLC, siendo monitorizado el gradiente mediante el uso de dos longitudes de onda, una a 215 nm y la otra a 276 nm. Al comenzar la aparición del peak en el cromatograma, la cual correspondía a la proteína previamente retenida en la matriz y que fue eluida por medio del buffer B, comenzó la recolección mediante el Fraction Collection en los tubos de ensayo dispuestos en el equipo. Posterior a la recolección, se realizó una electroforesis SDS-PAGE para verificar la inducción con IPTG del cultivo, además de la purificación del sobrenadante mediante la columna IMAC.

#### 4.3.6 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Para verificar la correcta inducción y purificación de  $\alpha$ -sinucleína, se realizaron dos electroforesis SDS-PAGE: la primera, para verificar la inducción se utilizó la alícuota correspondiente al control negativo (CN), un pellet inducido con IPTG 1 mM y el sobrenadante obtenido luego de la separación, y un segundo gel para verificar la pureza de la  $\alpha$ -sinucleína obtenida mediante purificación utilizando la columna IMAC. Se utilizó la metodología descrita por Laemmli [69] para llevar a cabo la electroforesis.

En primer lugar, se preparó la solución correspondiente al gel concentrador, añadiendo alcohol isopropílico en la superficie, con el fin de aislarlo del oxígeno

presente en el exterior, favoreciendo la polimerización del gel. A continuación, se eliminó el alcohol dispuesto en la superficie y se añadió la solución del gel separador y se colocó el peine para formar los pocillos donde se cargaron las muestras, siendo retirado luego de polimerizado el segundo gel. Los volúmenes para la preparación de ambos geles para la electroforesis se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2 Volumen para la preparación de dos geles de poliacrilamida preparados al 15% de concentración de acrilamida

Componentes	Gel concentrador (mL)	Gel separador (mL)
30% acrilamida/ 0.8% Bis-acrilamida	7,50	0,650
4x Tris-Cl/SDS pH 8.8	3,75	-
4x Tris-Cl/SDS pH 6.8	-	1,25
H <sub>2</sub> O	3,75	3,05
10% Persulfato de amonio	0,05	0,025
TEMED	0,01	0,005

#### 4.3.6.1 Desnaturalización proteica y corrida electroforética

Previo a cargar el gel de electroforesis, se alicuotaron 20 µL de cada una de las muestras a cargar, siendo para el primer gel el pellet no inducido o CN y el pellet inducido, además del sobrenadante obtenido luego de la fase de separación, y para el segundo gel el sobrenadante, el eluido que fue obtenido luego de la fase de purificación por la columna y la  $\alpha$ -sinucleína concentrada, posterior al uso de los filtros Amicon®. Además, se adicionó 5 µL de una mezcla preparada a partir de 900 µL de 4x “Laemmli Sample Buffer” (3,04 g Tris-base/HCl pH 6,8; 40 mL glicerol; 4,0 g SDS; 4 mL  $\beta$ -mercaptoetanol; 2 mg azul de bromofenol, y agua destilada aforando a 100 ml) y 100 µL de  $\beta$ -mercaptoetanol,

incubando en un agitador termorregulado por 5 minutos a 90°C. Seguido de esto, se cargó en el primer carril de ambos geles, 5 µL del marcador de peso molecular y desde el segundo hasta el décimo carril según el número de muestras, 15 µL de la muestra previamente incubada con la mezcla. La corrida electroforética se llevó a cabo a 100 mV por aproximadamente 2 horas.

#### *4.3.6.2 Fijación, tinción y lavado del gel*

Luego de terminada la corrida electroforética, se retiró el gel de la cámara para electroforesis, y se depositó en un pocillo de plástico para comenzar la fase de fijación utilizando una solución de 40% de etanol y 10% ácido acético, a 50 rpm por 30 minutos. Finalizada la fijación, los geles fueron teñidos utilizando la solución de trabajo de azul de Coomassie (80% v/v solución stock de azul de Coomassie y 20% v/v metanol), dejándolo a 50 rpm por toda la noche a 20°C. Al día siguiente, se retiró la solución de tinción, eliminando los excesos con agua destilada y se añadió la solución de lavado que consistía en 20% v/v de metanol y 15% v/v de ácido acético, para permitir la visualización del gel.

#### **4.3.7 Diálisis y concentración proteica**

La proteína recolectada fue dializada utilizando la membrana para diálisis SnakeSkin®, la cual posee poros de 10 kDa, reteniendo en el interior la  $\alpha$ -sinucleína, permitiendo el paso de las proteínas de menor peso. Para comenzar, se preparó la solución de buffer fosfato-salino (descrita en Materiales, Sección *Diálisis y concentración de  $\alpha$ -sinucleína*), y se dispuso en un vaso precipitado de 1 L; previamente la membrana fue ambientada con agua destilada, para luego añadir el volumen recolectado en su interior, asegurando ambos extremos con los SnakeSkin® Clips, con el fin de evitar la salida de lo recolectado. A continuación, se dejó agitando por 1 hora a 200 rpm, para luego cambiar el buffer

debido a la saturación del mismo, dejando nuevamente en agitación por 18 horas a 200 rpm.

Al día siguiente, la muestra que fue dializada se concentró utilizando un Filtro Amicon® con poros de 10 kDa, efectuando el siguiente protocolo: en una fase inicial, se centrifugó a 3.500 rpm por 15 minutos a 4°C, para disminuir el volumen previamente contenido en el filtro, luego se realizó una segunda concentración a 3.000 rpm por 5 minutos a 4°C, para disminuir nuevamente el volumen y aumentar la concentración proteica contenida en el interior. Seguido de esto, se realizó la medición de la concentración, utilizando el Fluorímetro.

#### 4.3.8 Medición de la concentración proteica

Terminado el proceso de diálisis y concentración de la proteína purificada, se determinó la concentración en el Fluorímetro Synergy H1, utilizando una longitud de onda de 276 nm que corresponde a Tyr [3,70], siendo calculada la concentración mediante la siguiente fórmula:

$$A = \epsilon \times d \times C$$

Donde **A** corresponde a la Absorbancia, **d** corresponde al diámetro de la cubeta utilizada,  **$\epsilon$**  corresponde al coeficiente de extinción molar, y que para  $\alpha$ -sinucleína corresponde a  $5.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [71] y **C** que es la concentración por determinar.

Luego de medida y alcanzada la concentración ideal de  $\alpha$ -sinucleína que es 20  $\mu\text{M}$ , fue alicuotada en 700  $\mu\text{L}$  contenido en tubos eppendorf, siendo almacenados a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización en los ensayos *in vitro* de agregación. En el caso de existir concentraciones más bajas de la ideal, se procedió a la

concentración centrifugando nuevamente en los filtros Amicon® a 3.000 rpm por 5 minutos a 4°C, leyendo nuevamente las concentraciones obtenidas en el Fluorímetro.

#### **4.3.9 Ensayo de agregación *in vitro*, monitoreado con ThT**

Los ensayos se realizaron para evaluar el nivel de inhibición que poseían seis moléculas derivadas de un extracto proveniente de la planta *Rosmarinus officinalis*, donados por el profesor Carlos Areche del Departamento de Química de la Universidad de Chile. Cada una de las moléculas fueron trabajadas en ciego, siendo denominadas como MLC1, MLC2, MLC3, MLC4, MLC5 y MLC6, respectivamente.

Inicialmente, se preparó un stock de la molécula a 10 mM para luego realizar diluciones seriadas con las siguientes concentraciones: 7,5 mM, 5,0 mM, 2,5 mM y 1,0 mM, utilizando DMSO como disolvente. Luego, utilizando la dilución 5,0 mM, se realizó un screening para obtener el porcentaje de inhibición de las seis moléculas en estudio, realizando posteriormente un ensayo de “dosis-respuesta”, a partir de la molécula que presentaba mayor actividad, evaluando las cinco concentraciones antes descritas.

Para realizar los ensayos, tanto el de screening como el de dosis-respuesta, se cargó en una placa de 96 pocillos, 100 µL de PBS correspondiendo al blanco, y 100 µL de  $\alpha$ -sinucleína 20 µM más 1 µL de DMSO, correspondiendo al control de agregación (CA). Para llevar a cabo el screening, se utilizó 100 µL de PBS y 100 µL de  $\alpha$ -sinucleína 20 µM más 1 µL de cada uno de los extractos a 5,0 mM, realizando esto último en duplicado. Con respecto al ensayo de dosis-respuesta, se utilizó 100 µL de PBS y 100 µL de  $\alpha$ -sinucleína 20 µM más 1 µL de las cinco

concentraciones de la molécula, realizando en duplicado cada una de ellas. Ambos ensayos se dejaron incubando a 37°C por 24 horas a 120 rpm.

Al día siguiente, se retiró una alícuota de 20 µL de cada uno de los pocillos del CA y de los que contenían las cinco concentraciones de la molécula, para realizar a partir de ella, la separación de las especies formadas en presencia y ausencia de la molécula, por medio de la columna SEC; el CA se encuentra en ausencia de la molécula. Luego, se adicionó 80 µL de ThT 50 µM a los pocillos del CA y al duplicado con las cinco concentraciones de la molécula y 100 µL a los pocillos de los blancos con PBS, dejando en incubación a 120 rpm por 1 hora a 37°C. Terminada la incubación, se procedió a la lectura del ThT en el equipo Synergy H1, utilizando una longitud de onda de excitación a 440 nm y una de emisión a 480 nm. Las alícuotas obtenidas fueron almacenadas a -80°C para su posterior separación.

#### **4.3.10 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

A partir de las alícuotas obtenidas posterior a las 24 horas de incubación del ensayo de agregación de dosis respuesta, se realizó la separación de las especies formadas utilizando una columna SEC, la cual se basa en el principio de la separación de analitos en base a su tamaño, utilizando HPLC para optimizar los tiempos de retención y elusión, similar a lo que sucede con la columna IMAC para la purificación. Para llevar a cabo la separación, se realizó un gradiente de tipo isocrático, utilizando el buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , además de monitorizar la separación mediante el uso de las longitudes de onda 276 nm y 215 nm. En la Tabla 3, se detalla el tipo de gradiente generado para realizar la separación.

Tabla 3 Protocolo utilizado para la generación del gradiente de concentración.

Tiempo (minutos)	Buffer A (%)	Agua (%)	Flujo (mL/min)
0	20	80	0,5
40	30	70	0,5

Para iniciar el método, se cargaron 10  $\mu$ L de las alícuotas con la jeringa Microliter™ en el *loop* de carga del HPLC. El método duró 40 minutos, sin embargo, a los 20 minutos de iniciado el gradiente con el buffer A, comenzó la aparición de un peak correspondiente al monómero de la  $\alpha$ -sinucleína. Por otro lado, luego de cargar el CA, se evidencio un peak a los 10 minutos de iniciado el gradiente, correspondiente a las especies de mayor tamaño de la  $\alpha$ -sinucleína.

#### 4.3.11 Análisis de datos y procesamiento de imágenes

Para en análisis cuantitativo de las fluorescencias obtenidas en los ensayos de agregación *in vitro*, se utilizó el programa GraphPad Prism 6. Para el análisis de las imágenes se utilizó Adobe Illustrator CS5. Los valores obtenidos del Fluorímetro a partir de la fluorescencia del ThT, fueron presentados en promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM), realizando el análisis estadístico con ANOVA de un solo factor -one way ANOVA- utilizando el Test Dunnett para el análisis de la varianza. Los valores menores de  $*p<0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## CAPÍTULO 5 RESULTADOS

### 5.1 Producción de $\alpha$ -sinucleína recombinante

Luego del proceso de clonamiento de la secuencia de  $\alpha$ -sinucleína, dentro del vector pET-28a(+), se procedió a la transformación de bacterias *E. coli* BL21 (DE3), para la producción de  $\alpha$ -sinucleína recombinante, mediante la inducción con IPTG. Además, previo a adicionar IPTG, se obtuvo una alícuota correspondiente al CN, utilizado para comparar mediante un SDS-PAGE al 15% de acrilamida-bisacrilamida, la correcta inducción del cultivo bacteriano. En la Figura 11 se observa el gel obtenido luego de la electroforesis.

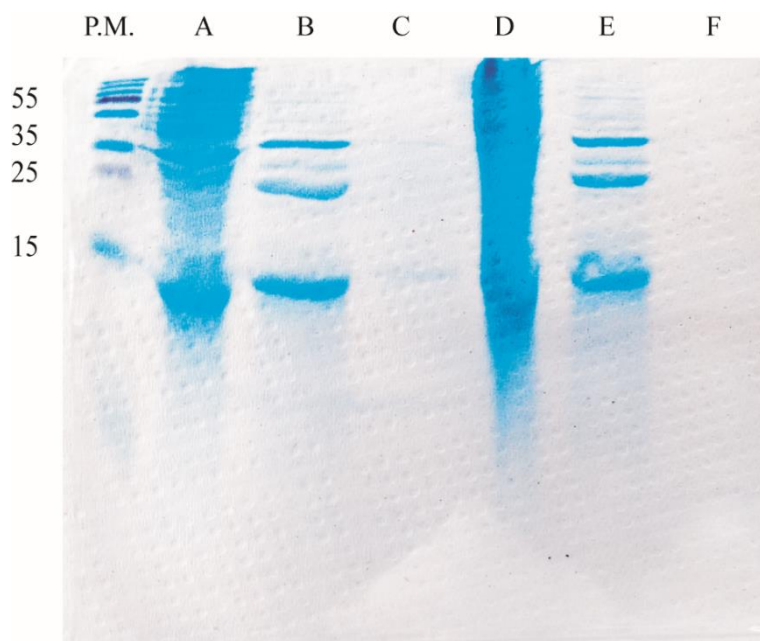


Figura 11 SDS-PAGE Acrilamida/bis-acrilamida 15%.

Gel utilizado para verificar la expresión de  $\alpha$ -sinucleína, comparando un cultivo inducido con IPTG y un cultivo no inducido. El carril P.M. corresponde al Marcador PageRuler™ Plus Prestained Protein Lader, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific®). Carril A y D: sobrenadante obtenido a partir del CN; no se observa con claridad la presencia de una banda más marcada a la altura de los 15 kDa. Carril B y E: sobrenadante obtenido de un cultivo inducido con IPTG por 3 horas, observándose la presencia de una banda marcada cercana a los 15 kDa, correspondiente a la  $\alpha$ -sinucleína recombinante. Carril C y F: eluido obtenido luego de la purificación con la columna ProPac-IMAC utilizando HPLC; no se logra distinguir la banda debido a que no ha sido concentrada en los filtros Amicon®.



## 5.2 Purificación de $\alpha$ -sinucleína mediante IMAC

Posterior a la inducción con IPTG, se procedió a la fase de separación que incluía ciclos de sonication y congelado, a fin de obtener el sobrenadante que posteriormente sería purificado mediante la columna ProPac-IMAC. Para llevar a cabo la purificación, se utilizó un gradiente no isocrático, monitorizada mediante las longitudes de onda 276 nm y 215 nm. El gradiente generado duró 40 minutos, sin embargo, a los dos minutos de iniciado, y a una concentración de 89% de buffer A y 11% de buffer B, comenzó la formación de un peak en el cromatograma que correspondió a la proteína previamente retenida en la matriz y que fue eluida por medio del buffer B, siendo recolectada mediante el Fraction Collection en los tubos de ensayo dispuestos en el equipo, observándose en la Figura 12 el cromatograma generado.

Para confirmar la presencia de  $\alpha$ -sinucleína en el sobrenadante que fue purificado, se realizó un SDS-PAGE al 15% de acrilamida-bisacrilamida con el sobrenadante, el eluido obtenido luego de la purificación y la  $\alpha$ -sinucleína concentrada utilizando los filtros Amicon® de 10 kDa. En la Figura 13 se observa el gel obtenido luego de la electroforesis.

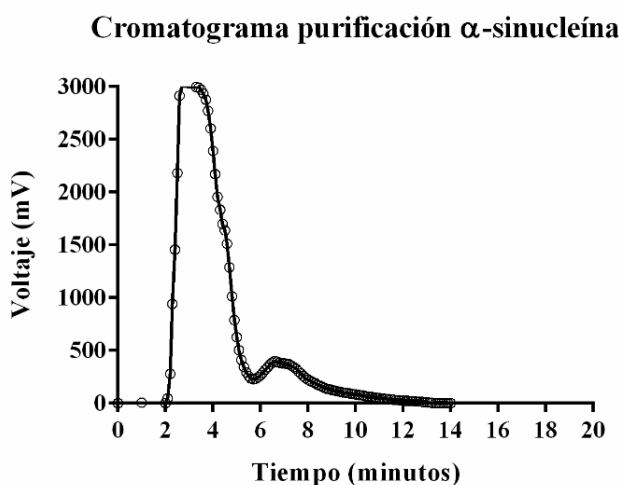


Figura 12 Cromatograma generado mediante la purificación de  $\alpha$ -sinucleína con la columna IMAC.

Para realizar la purificación de la  $\alpha$ -sinucleína, se utilizó una columna ProPac-IMAC, con  $\text{Co}^{+2}$  en su matriz. En el *loop* de carga del HPLC se colocó 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se inició el método, por medio de la formación de un gradiente a partir del buffer A que contiene 20 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de HEPES y el buffer B que posee 500 mM de imidazol, 500 mM de NaCl, 20 mM de HEPES. El monitoreo de la purificación se realizó utilizando dos longitudes de onda, 276 nm y 215 nm.

Aproximadamente, a los 2,86 minutos de iniciado el gradiente, se observó el inicio del peak correspondiente al monómero de la  $\alpha$ -sinucleína, el cual tuvo un tiempo de retención de 3,78 minutos debido a que el descenso del peak se alcanzó a los 6,62 minutos. El cromatograma obtenido esta realizado a partir de la lectura de la longitud de onda de 276 nm.

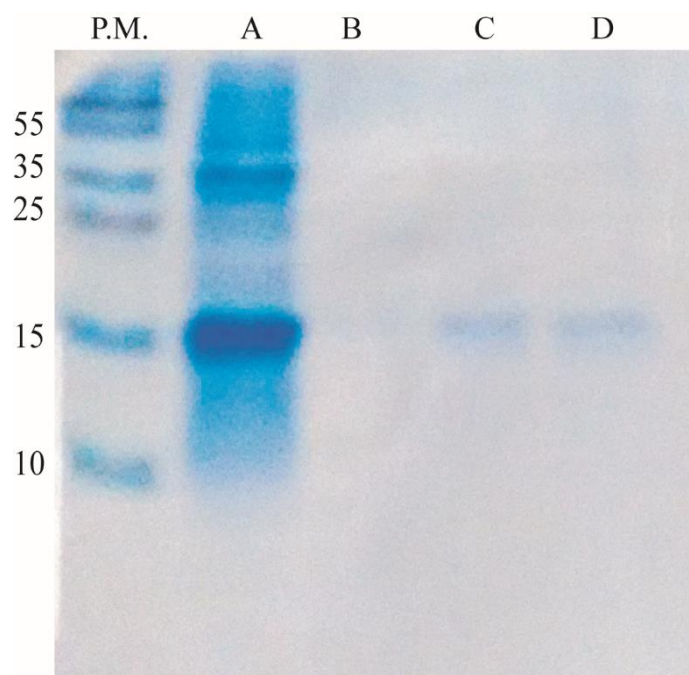


Figura 13 SDS-PAGE Acrilamida/bis-acrilamida 15%.

Gel utilizado para verificar la purificación realizada con la columna ProPac-IMAC, mediante HPLC. El carril P.M. corresponde al Marcador PageRuler™ Plus Prestained Protein Lader, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific ®). Carril A: corresponde al sobrenadante obtenido luego de los ciclos de sonificado y congelado, se observa una banda marcada cercana a los 15 kDa, correspondiendo a la  $\alpha$ -sinucleína recombinante.

Carril B: eluido obtenido mediante purificación con HPLC; se observa una banda débil debido a que no está concentrado. Carril C y D:  $\alpha$ -sinucleína recombinante, luego de ser dializada y concentrada.

### 5.3 Ensayo *in vitro* de agregación con ThT

Inicialmente, se realizó un screening de la actividad inhibitoria que poseían las seis moléculas en estudio, utilizando la concentración de 5,0 mM de cada una de ellas. Luego de obtenidas las lecturas de fluorescencia del ThT, se graficaron los resultados, calculando los porcentajes de inhibición que presentaban. En la Figura 14 se muestra el grafico obtenido luego de comparar las actividades de las seis moléculas frente al CA y en la Tabla 4 los porcentajes de inhibición de cada una de ellas

Por otro lado, a la molécula 6 se le realizó un ensayo de dosis-respuesta, utilizando las cinco diluciones realizadas a partir del stock, sean 7,5 mM, 5,0 mM, 2,5 mM y 1,0 mM, además del stock que es de 10 mM. A su vez, se graficaron las lecturas de fluorescencia del ThT obtenidas en el Fluorímetro, calculando los porcentajes de inhibición que presentaban cada una de las concentraciones de la molécula en estudio. En la Figura 15 se muestra el grafico de dosis-respuesta obtenido y en la Tabla 5, los porcentajes de inhibición de cada una de las concentraciones. Además, se determinó el IC<sub>50</sub> que presentaba la molécula 6, graficándose el resultado en la Figura 16.

Posterior a la realización de la determinación del IC<sub>50</sub>, y debido a la evidencia existente acerca de la capacidad para inducir la agregación que presenta la heparina, se realizó un ensayo para confirmar si existía diferencia significativa al comparar la actividad inhibitoria que presenta la molécula 6 en presencia y ausencia de heparina; cabe recalcar que los ensayos de agregación *in vitro* se llevaron a cabo en ausencia de heparina. En la Figura 17 se observa el grafico

obtenido en presencia y ausencia de heparina y en la Tabla 6, los porcentajes de inhibición obtenidos en presencia y ausencia de Heparina.

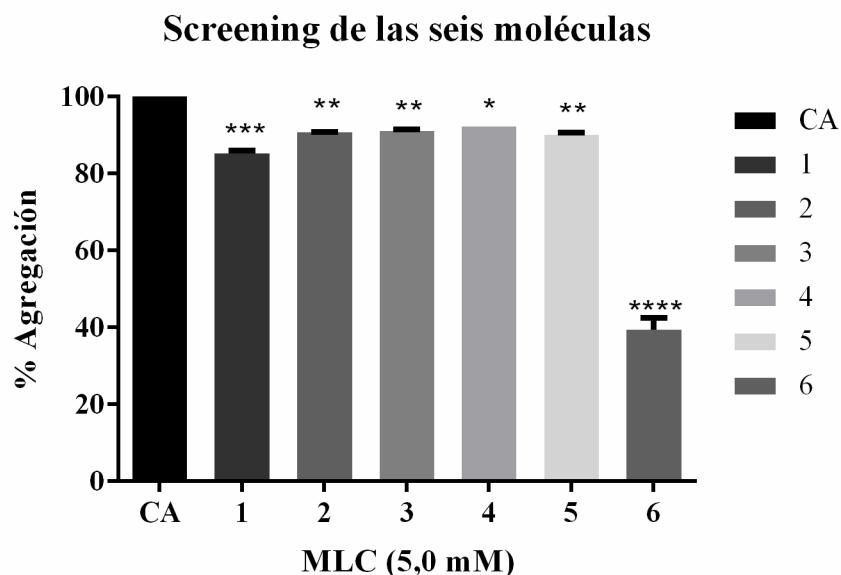


Figura 14 Grafico del screening realizado con las seis moléculas.

Ensayo *in vitro* de screening con las seis moléculas utilizando la dilución 5,0 mM a partir del stock 10 mM de cada una de ellas, realizándose el ensayo con  $\alpha$ -sinucleína 20  $\mu$ M, siendo monitorizado con ThT a las 24 horas de incubación. Las barras obtenidas corresponden al promedio  $\pm$  SEM de al menos dos lecturas diferentes de fluorescencia, con un  $p < 0.0001$ , lo que señala que existe diferencia significativa entre el CA y los porcentajes de inhibición obtenidos en cada una de las barras. Sin embargo, existen diferencias significativas entre las moléculas, observándose que la MLC6 presenta el mayor porcentaje de inhibición, específicamente de 61% a diferencia de la MLC4 que presentó la menor inhibición con un 8%. Los porcentajes de cada molécula estudiada se describen en la Tabla 4.

Tabla 4 Porcentajes de inhibición de las seis moléculas en estudio.

Molécula	Porcentaje de inhibición (%)
1	15
2	9
3	9
4	8
5	10
6	61*

#### Ensayo *in vitro* de dosis-respuesta

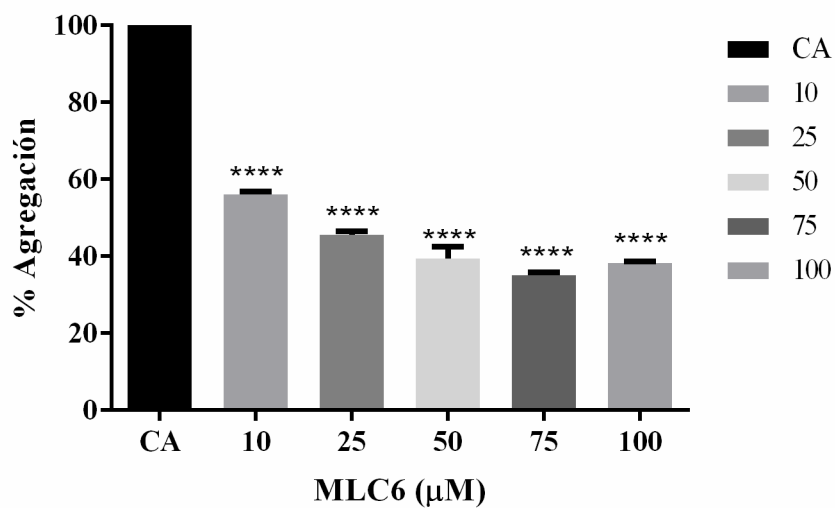


Figura 15 Grafico del ensayo de agregación *in vitro* de dosis-respuesta de la MLC6.

Ensayo *in vitro* de dosis-respuesta utilizando 20 μM de α-sinucleína, además de las cinco diluciones de la MLC6, sean 1 mM; 2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM; 10 Mm, siendo monitorizado con ThT a las 24 horas de incubación. Las barras obtenidas corresponden al promedio ± SEM de al menos dos lecturas diferentes de fluorescencia, con un  $p < 0.0001$  señalando que existe diferencia significativa

entre el CA y los porcentajes de inhibición obtenidos utilizando las cinco concentraciones de la MLC6. El mayor porcentaje de inhibición de la agregación se observa en la concentración de 75  $\mu\text{M}$  con un 65% de inhibición, seguido de 100  $\mu\text{M}$  con un 62% de inhibición y 50  $\mu\text{M}$  obteniéndose un 61% de inhibición. Los porcentajes se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5 Porcentajes de inhibición de las cinco concentraciones utilizadas para el ensayo de dosis-respuesta.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Porcentaje de inhibición (%)
10	44
25	54
50	61
75	65
100	62

#### Regresión logarítmica para calculo de $\text{IC}_{50}$

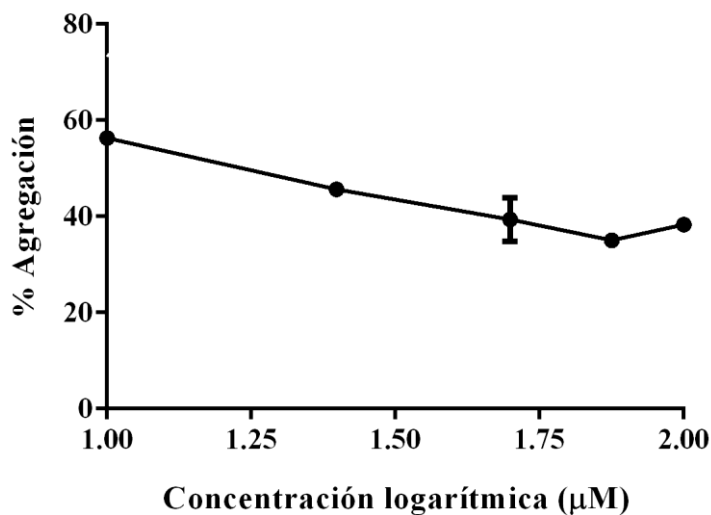


Figura 16 Determinación del  $\text{IC}_{50}$ .

Se determinó el  $\text{IC}_{50}$  que presentaba la MLC6 luego de realizar el ensayo de dosis-respuesta, monitoreado con ThT tras 24 horas de incubación.

Posterior a la realización del ensayo de dosis-respuesta, se realizó la determinación del IC<sub>50</sub>, mediante una regresión logarítmica, obteniendo como resultado 27,98  $\mu$ M de la MLC6.

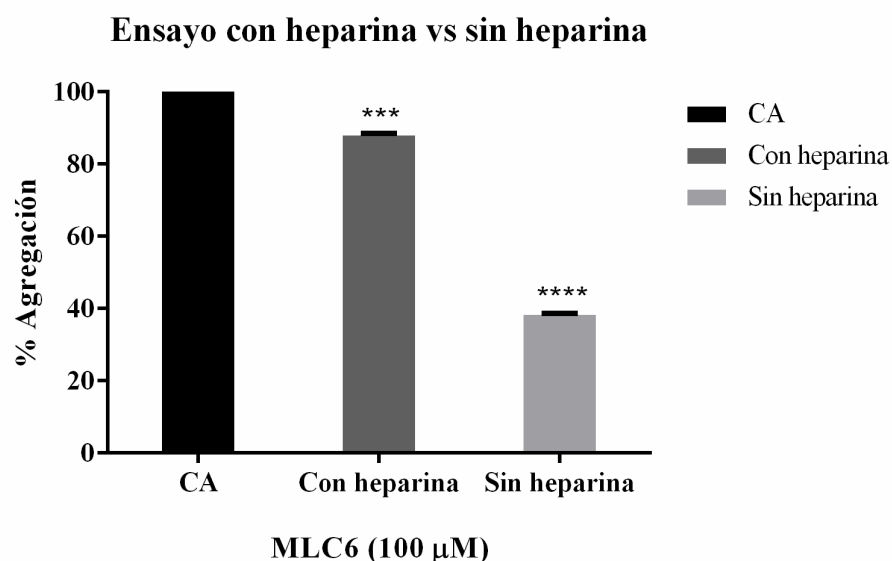


Figura 17 Comparación de la actividad inhibitoria de la MLC6 en presencia y ausencia de heparina.

Posterior al ensayo de dosis-respuesta con la MLC6, se realizó la comparación del porcentaje de inhibición en presencia y ausencia de heparina, utilizando 20  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína y la dilución 10 mM de la MLC6, siendo monitoreada la agregación con ThT, luego de 24 horas de incubación. Las barras obtenidas corresponden al promedio  $\pm$  SEM de al menos dos lecturas de fluorescencia distintas, con un  $p < 0.0001$ , lo que señala que existe diferencia significativa entre el CA y el porcentaje de inhibición en presencia y ausencia de heparina, sin embargo, al analizar ambas condiciones, se observa mayor significancia estadística en ausencia de heparina.

Tabla 6 Porcentaje de inhibición de la MLC6

Variable	Porcentaje de inhibición (%)
Con heparina	12
Sin heparina	62

#### 5.4 Separación de especies utilizando columna SEC

Posterior a la realización del ensayo de dosis-respuesta y previo a realizar el monitoreo con ThT, se obtuvieron alícuotas de 20  $\mu$ L correspondientes al CA, además de las cinco concentraciones de la MLC6 que estuvieron en contacto con la  $\alpha$ -sinucleína durante la realización del ensayo. Las alícuotas fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para evitar la posible auto-agregación que fuese a presentar la  $\alpha$ -sinucleína previo a realizar la separación mediante la columna SEC.

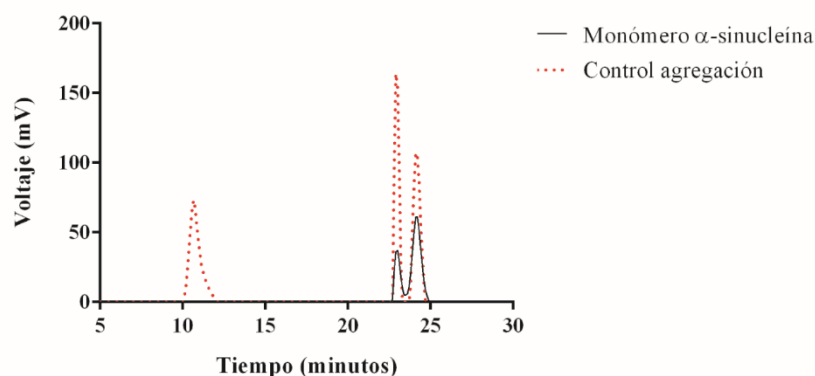
Para llevar a cabo la separación de las especies de diferente tamaño de la  $\alpha$ -sinucleína, se utilizó la columna SEC, además de un gradiente isocrático formado con el buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , con una duración de 40 minutos para permitir la exclusión de los analitos en estudio. Por otro lado, al igual que para llevar a cabo la purificación por medio de IMAC, para monitorizar la separación se utilizaron las longitudes de onda 215 nm y 276 nm.

Inicialmente, se cargaron 10  $\mu$ L de la alícuota del monómero de  $\alpha$ -sinucleína de 20  $\mu$ M, observándose un peak aproximadamente a los 20 minutos de iniciado el gradiente. Por otro lado, luego de cargar 10  $\mu$ L de la alícuota del CA, se observó un peak a los 10 minutos de iniciado el gradiente correspondiendo al oligómero de la  $\alpha$ -sinucleína. Cabe destacar que ambas alícuotas presentaron diferentes tiempos de retención en la columna, dado principalmente por el tamaño de ambas estructuras proteicas separadas.



A

#### Cromatograma Monómero vs Control de agregación



B

#### Cromatograma Control de agregación vs MLC6

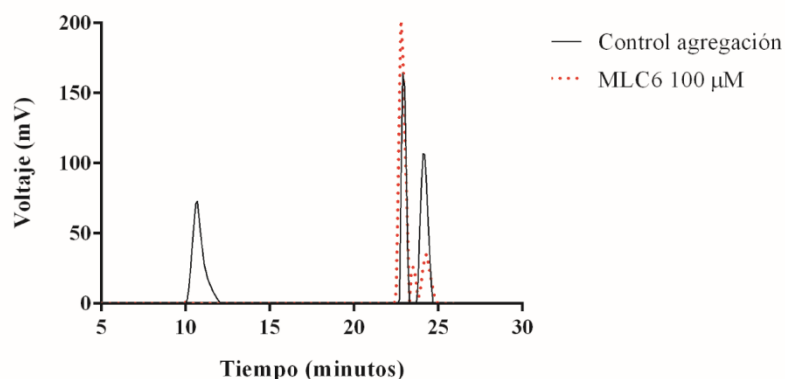


Figura 18 Cromatogramas obtenidos de la separación de las alícuotas mediante columna SEC

Posterior al ensayo de agregación, se realizó el análisis de las especies formadas durante el ensayo de agregación, observándose peaks característicos para cada alícuota cargada en la columna SEC. Es importante considerar que cada alícuota fue cargada por separado, por lo que se obtuvo un cromatograma de cada uno, comparándose posteriormente los datos obtenidos a fin de evidenciar las diferencias entre cada uno.

Con respecto al cromatograma A, se observa la comparación del monómero de  $\alpha$ -sinucleína y el CA, observándose la diferencia en el peak formado aproximadamente a los 10 minutos, presentándose solamente en el

cromatograma de la alícuota del CA. La alícuota de la  $\alpha$ -sinucleína de 20  $\mu$ M, solo se presentó un peak cercano a los 20 minutos de iniciado el gradiente. A su vez, al realizar la comparación en el cromatograma B, entre el CA y la MLC6, se obtuvo solo un peak cercano a los 20 minutos, correspondiendo a especies de menor tamaño, debido a la similitud con el tiempo de retención que presentaba el monómero de la proteína.

## CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN

Los ensayos *in vitro* constituyen una herramienta necesaria para la búsqueda de nuevas moléculas que puedan interactuar en el proceso de agregación que sufre la  $\alpha$ -sinucleína en la EP. En la actualidad, se ha descrito la capacidad de algunas moléculas de interactuar de diferentes formas, algunas de ellas actúan directamente en el proceso de agregación, impidiendo la formación de oligómeros insolubles, evitando la formación de una fibra amiloide completa, y otras han descritos la actividad anti-citotóxica, debido a que la molécula logra impedir la unión de la fibra amiloide a la membrana celular [58]. Estas moléculas forman parte del grupo de los polifenoles, y en la actualidad se ha comprobado su actividad antioxidante, con gran participación en la disminución del avance de las enfermedades neurodegenerativas en general [53-58]. Es por esto, que se evaluó el efecto inhibitorio que poseían seis moléculas provenientes de la planta *Rosmarinus officinalis*, debido al efecto antioxidante que posee gracias a la presencia de diversas moléculas de características polifenólicas [55], específicamente grupos oxidados en posición 3-4 *ortho* quinona [53,54], la cual se asemeja a la estructura química de la dopamina; un neurotransmisor involucrado en la disminución de las especies oligoméricas que se generan fisiológicamente en el interior de las células dopaminérgicas [11,12].

Para ello, se realizaron ensayos de agregación *in vitro* utilizando  $\alpha$ -sinucleína recombinante, obtenida a partir del clonamiento de la secuencia de la proteína en el vector pET-28a (+), para posteriormente transformar células competentes obtenidas de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3). El vector utilizado posee dentro de su estructura un gen que codifica para la resistencia a antibióticos, un gen *lacI* que codifica para el represor *lac* y la región con la  $\alpha$ -sinucleína insertada río abajo del promotor T7 RNA. Dentro del genoma de la *E. coli* existe la región *lacO* la cual, luego de unirse lactosa o un análogo de ella como el IPTG, permite que la T7 RNA polimerasa, pueda transcribir los genes ubicados río abajo [64],

coincidiendo con la presencia de  $\alpha$ -sinucleína, además de incorporar un *tag* de polihistidinas en la región N-terminal [65]. La utilización de un antibiótico, como es la kanamicina durante el cultivo bacteriano, facilita la obtención de clones que hayan sido capaces de incorporar dentro de su material genético el vector, debido a que el vector utilizado posee una región de resistencia a dicho antibiótico [68]. Previo a la inducción con IPTG, es necesario alcanzar una DO comprendida entre 0,4 – 0,6, la cual coincide con la mitad de la fase de desarrollo y multiplicación bacteriana, previo a llegar a la fase estacionaria, donde se produce el agotamiento del medio cultivo, y la inducción de proteasas [62]. Para comprobar la inducción, se realizó un SDS/PAGE al 15% de acrilamida-bisacrilamida, comparándose el pellet obtenido luego de la centrifugación, antes y después de adicionar IPTG al cultivo bacteriano, observándose una banda marcada a los 15 kDa coincidiendo con el peso molecular de la  $\alpha$ -sinucleína, que es de 14 kDa [14].

Posterior a la inducción, se realizó la purificación de la  $\alpha$ -sinucleína utilizando una columna ProPac-IMAC que poseía  $\text{Co}^{+2}$  en su matriz, la cual interacciona con la cola de histidinas presentes en la región N-terminal de la proteína [65]. Además de la resina con el metal incorporado, es necesaria la utilización de buffers que generen la fase móvil necesitara para llevar a cabo la retención y elusión de la proteína, es por esto, que para llevar a cabo la purificación se utilizaron concentraciones de NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, debido a que a bajas concentraciones de imidazol, se logra disminuir el número de proteínas que se unen inespecíficamente a la matriz, debido a que el imidazol participa como un análogo de la histidina [64]. Por otra parte, al aumentar la concentración de imidazol sobre los 100 mM, actúa eluyendo competitivamente las uniones de la cadena de histidinas de la matriz [62-64].

Para la visualización de la  $\alpha$ -sinucleína obtenida mediante purificación, se realizó un SDS/PAGE al 15% de acrilamida-bisacrilamida, de tres muestras obtenidas durante el proceso de purificación. La primera corresponde al sobrenadante obtenido luego de la fase de separación del cultivo bacteriano,

observándose una banda marcada en el gel cercana a los 15 kDa, correspondiente a la  $\alpha$ -sinucleína, además de una serie de bandas superiores a los 25 kDa, correlacionándose con la presencia de restos bacterianos resistentes a los cambios de temperatura. Además, fue necesaria la recolección de la elusión de la columna, correspondiendo a la  $\alpha$ -sinucleína pura, sin embargo, no se logra apreciar claramente la banda debido a que no ha sido concentrada, por lo que, para confirmar el tamaño de la proteína purificada, fue necesario concentrar la elusión obtenida mediante filtros Amicon® con poros de 10 kDa y cargar lo obtenido en el gel, permitiendo visualizar una única banda cercana a los 16 kDa (incluyendo el His tag) correspondiendo a la  $\alpha$ -sinucleína pura.

En la actualidad existen otro tipo de técnicas para la purificación de proteínas, como la cromatografía por exclusión molecular (SEC), la cual se basa principalmente en la separación de proteínas en base a su tamaño [66] bajo condiciones que preserven su actividad biológica, utilizando longitudes de onda en el espectro UV para la realización del cromatograma y obtención de los peak característicos para cada analito [67], sin embargo, es necesario la confirmación de las eluciones obtenidas a partir de esa columna, por lo que Huang y sus colaboradores describen la utilización de la fluorescencia intrínseca de la Tyr, utilizando una longitud de onda de 303 nm para realizar la detección específica de dicho aminoácido en la elusión obtenida de la columna SEC [72], correlacionándose con las longitudes de onda utilizadas en este estudio para realizar los ensayos de agregación, los cuales, además de ser monitoreados con ThT fueron evaluados utilizando el tiempo de resolución de la Tyr que posee una longitud de onda para excitación máxima de 276 nm y una de emisión máxima a 303 nm. Por otra parte, Hage describe la utilización de ambas metodologías para la purificación de proteínas, denominándola ImadSEC [73]. Sin embargo, la columna IMAC dada su capacidad de purificación más específica debido a la interacción del metal con la secuencia aminoacídica presente en la proteína recombinante, nos permite discriminar entre las especies eludidas, a diferencia de la columna SEC que solo separa por tamaño todos los analitos contenidos en

la muestra, por lo que posee mayor utilidad en la separación de las especies formadas, posterior al ensayo de agregación, debido a que se podrían comparar tanto los tamaños de las estructuras oligoméricas de la  $\alpha$ -sinucleína, como las formadas luego de interaccionar con el polifenol.

Luego de la purificación de la  $\alpha$ -sinucleína, se realizó la medición de la concentración utilizando una longitud de onda de 276 nm, que corresponde a Tyr, a su vez, se describe que la absorción de las proteínas generalmente es cercana a 280 nm tanto para Tyr como el Trp [61], por lo que se correlaciona con la longitud de onda utilizada, sin embargo, en nuestro estudio detectamos que al realizar el cálculo de la concentración utilizando ambas longitudes de onda, existía una diferencia de  $\sim 10 \mu\text{M}$ , afectando el cálculo de la concentración ideal descrito por Narkiewicz, que corresponde a  $45 \mu\text{M}$  [34]. Es por esto, que además de la lectura de absorbancia, se realizó la lectura de la fluorescencia intrínseca de la Tyr, utilizando las longitudes de onda 276 nm para excitación y 303 nm para la emisión de fluorescencia [61,74], confirmando la concentración real que poseía la  $\alpha$ -sinucleína antes de realizar los ensayos *in vitro* de agregación. Huang refiere el uso de una longitud de onda de 275 nm para excitación de Tyr [72], a diferencia de Lorenzen y sus colaboradores, que utilizaron una longitud de onda de 280 nm.

### **Factores externos participan en el proceso de agregación de la $\alpha$ -sinucleína**

Además de la medición de la concentración para realizar el ensayo, es necesario tener en consideración diversos factores externos que influyen en el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína [34], específicamente disminuyendo la actividad inhibitoria que puedan presentar los polifenoles en el ensayo de agregación *in vitro*; algunos de los factores observados fueron: heparina, temperatura, agitación y concentración.

Con respecto a la heparina, diversos estudios la describen como un acelerador de la agregación, debido a la capacidad que posee de generar especies oligoméricas capaces de formar fibras amiloides, debido a que facilita la interacción entre oligómeros para formar la fibra completa [75-76]. Torres-Bugeau describe el aumento exponencial que sufre la intensidad de la fluorescencia emitida por el ThT al estar en contacto con heparina, concluyendo que dicho incremento no se correlacionaría con la cinética de la agregación, debido a que demostró que posterior a la incubación de la  $\alpha$ -sinucleína con heparina por 1 hora, el ThT no logró evidenciar la presencia de agregación de la proteína [75].

Por otro lado, Narkiewicz y sus colaboradores describen el efecto de la temperatura en la fase inicial del proceso de agregación, señalando su participación en las interacciones hidrofóbicas de la  $\alpha$ -sinucleína, debido a los cambios estructurales producidos durante la incubación, además de la tendencia a la formación de especies oligoméricas parcialmente unidas entre ellas [34]. A su vez, Torres-Bugeau señala la participación de la temperatura en la formación de oligómeros de tipo amiloide [75]. A lo largo de nuestro estudio se detectó que la temperatura juega un rol específico en las actividades de los polifenoles, debido a qué, si comparamos la actividad inhibitoria a 25°C, esta es menor a la obtenida a una temperatura de 37°C. Por lo tanto, es importante la realización de estudios que sean capaces de confirmar los tipos de estructuras que se generan utilizando ambas temperaturas, permitiendo evaluar si la actividad inhibitoria es dependiente de la temperatura o no.

Diversos estudios señalan que la agitación juega un rol crucial en la cinética del proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, debido a la disminución de la fase inicial [38], sin embargo, no se tiene certeza acerca de las estructuras que se forman en relación con la velocidad utilizada, existiendo la teoría de la formación de especies parcialmente unidas de  $\alpha$ -sinucleína, así como también, la formación de intermediarios de la fibrilización [34]. Narkiewicz señala que la agitación incrementa la colisión entre las especies monoméricas y oligoméricas con las

fibras amiloides, describiendo el uso de velocidades comprendidas entre 120 rpm hasta 1.000 rpm [34]. Deas, Cremades, Lorenzen y Nielsen, describen el uso de una agitación orbital para la obtención de especies oligoméricas, utilizando 200 rpm ambos, 900 rpm y 300 rpm, respectivamente [44-45,58,76]. Previamente, nuestros ensayos de agregación *in vitro*, los realizamos utilizando una velocidad de 100 rpm, sin embargo, no alcanzábamos valores altos de fluorescencia luego de adicionar ThT, por lo que decidimos aumentar la velocidad de agitación a 150 rpm, obteniendo lectura más altas de fluorescencia, siendo similares a las descritas en la literatura, permitiendo correlacionar dicho aumento a la formación acelerada de especies oligoméricas ricas en hoja- $\beta$  [59], aunque dicho aumento de la fluorescencia no se correlacionaba con el porcentaje de inhibición que poseían los polifenoles, debido a que si se comparaba la incubación de las seis moléculas a 150 rpm, el porcentaje de inhibición era inferior, a cuando se realizaba el ensayo a 120 rpm, siendo similar a la velocidad mínima, descrita por Narkiewicz para llevar a cabo el ensayo de agregación [34].

Para llevar a cabo un ensayo de agregación exitoso, Narkiewicz señala que se debe utilizar una concentración entre 35 a 70  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -sinucleína, considerando una concentración ideal de 45  $\mu\text{M}$  y una concentración mínima de 14  $\mu\text{M}$  para llevar a cabo el ensayo *in vitro* [34]. Sin embargo, tanto el screening como el ensayo de dosis-respuesta, se realizaron utilizando una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , debido a que, a concentraciones superiores de  $\alpha$ -sinucleína, el efecto inhibitorio de los polifenoles estudiados era inferior.

Para realizar la monitorización del proceso de agregación se utilizó ThT debido a su capacidad de unión específica a la hoja- $\beta$  presente en las fibras amiloide [3,59-61]. Biancalana describe la unión del ThT con las laminillas de hoja- $\beta$  formadas durante la agregación [59], correlacionándose con lo descrito por Mučibabić, que señala que el ThT se une específicamente a la hoja- $\beta$  presente en las estructuras secundarias y la fibra amiloide formada a partir de  $\alpha$ -sinucleína [77], siendo directamente proporcional la presencia de dichas estructuras



secundarias con la intensidad de la emisión de fluorescencia [59], permitiendo monitorear el proceso de agregación junto a la formación de estructuras durante dicho periodo, permitiendo describir la presencia de la fase inicial o *lag-phase*, la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria [33,71]. El ThT luego de ser añadido al ensayo, se dejó incubando por 1 hora a 120 rpm, leyendo posteriormente la excitación y emisión de fluorescencia del marcador, utilizando una longitud de onda a 440 y 480 nm, graficando las lecturas del screening y del ensayo de dosis-respuesta.

Posterior a la lectura de fluorescencia del ensayo de screening, se observó que la MLC6 presentaba un 61% de actividad inhibitoria a diferencia de la actividad del resto de las moléculas, sean las moléculas 1-5 con los porcentajes de inhibición 15%, 9%, 9%, 8%, 10%, respectivamente. Dado los resultados obtenidos acerca de la diferencia significativa que presentaba la MLC6 en comparación de las otras, se realizó un ensayo de dosis-respuesta, obteniendo el máximo porcentaje de inhibición en la concentración 75  $\mu$ M; específicamente 65% de inhibición. Por otro lado, al realizar el cálculo del IC50 por medio de una regresión logarítmica, se obtuvo que dicha concentración corresponde a 27,98  $\mu$ M de la MLC6.

Dada la evidencia existente acerca de la inducción de la agregación por parte de la heparina [75-76], se realizó la comparación de la actividad inhibitoria que presentaba la MLC6 a 10 mM en presencia y ausencia de heparina, siendo monitorizado por ThT. Luego de adicionar el ThT, se observó que la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de heparina, presentaba una menor actividad inhibitoria, específicamente 12%, a diferencia cuando está en ausencia de la misma presentando una actividad inhibitoria de 62%. Este fenómeno se produce debido a que la heparina promueve la formación de la fibra amiloide [74-75], dificultando la interacción del polifenol con los monómeros de  $\alpha$ -sinucleína. Sin embargo, es necesario considerar la realización de estudios que nos permitan confirmar el tipo de estructuras formadas en presencia y ausencia de heparina, además de la

influencia en el tipo de estructuras formadas en presencia del polifenol, al estar en contacto con heparina. En la Figura 17 se observa el grafico comparando la actividad inhibitoria del polifenol en presencia y ausencia de heparina.

Además de los ensayos de agregación, se realizó la separación de las estructuras formadas en el CA utilizado en el ensayo de agregación, además de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la MLC6. Para ello, se utilizó la columna BioSep s2000, la cual corresponde a una columna de tipo SEC, capaz de separar analitos, proteínas o agregados en relación a su tamaño [66-67], utilizando la metodología del HPLC para optimizar los tiempos de retención y elusión generados con el buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Para llevar a cabo la separación, se cargó 10  $\mu\text{L}$  de la alícuota del CA, así como de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la MLC6, observándose diferencias en los cromatogramas.

A los 22 minutos de iniciado el cromatograma de la  $\alpha$ -sinucleína de 20  $\mu\text{M}$ , se observó un peak significativo, siendo identificado como el monómero de la proteína, con un tiempo de retención de  $\sim 2$  minutos. Sin embargo, luego de cargar el CA, comenzó la aparición de un peak a los 10 minutos de iniciado el gradiente correspondiendo a una especie de mayor tamaño, siendo identificada como el oligómero de la  $\alpha$ -sinucleína, con un tiempo de retención de 1,7 minutos, además de un peak a los 22 minutos con un tiempo de retención similar al monómero. En un estudio realizado por Ardah y sus colaboradores, describieron la presencia de un peak cercano a los 10 minutos en la columna SEC, denominándolo como una estructura oligomérica de la  $\alpha$ -sinucleína [78].

A su vez, luego de cargar la alícuota que contenía la  $\alpha$ -sinucleína más la MLC6, comenzó la aparición de un peak cercano a los 23 minutos, con un tiempo de retención de  $\sim 0,4$  minutos, coincidiendo con el peak monomérico, pero con una mayor altura que el CA. Lorenzen, luego de probar el efecto de un polifenol presente en el té verde, describió su efecto de dos maneras, el primero es que actúa remodelando la fibra amiloide, formando especies no toxicas, y por otra

parte, generando especies monoméricas debido a su acción en el inicio del proceso de agregación [58], siendo similar al efecto observado con la MLC6, específicamente en la estabilización de las especies monoméricas debido al aumento en el peak del tiempo de retención del monómero de  $\alpha$ -sinucleína, además de la ausencia de una estructura más grande tipo oligómero. Sin embargo, es necesario confirmar el peso molecular que poseen cada una de las estructuras presentes en los peak obtenidos de la columna SEC, ya sea en presencia como en ausencia del polifenol en estudio. En la Figura 18, se observan los cromatogramas obtenidos de la columna SEC con el peak correspondiente al monómero de  $\alpha$ -sinucleína, el CA y la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la MLC6.

## CAPÍTULO 7 CONCLUSIÓN

A lo largo de este estudio, se estudió el efecto inhibitorio de una serie de polifenoles provenientes del *Rosmarinus officinalis*, debido a que en la actualidad se ha descrito como una planta con capacidades antioxidantes, dados los tipos de moléculas que posee [55]. Es por esto, que se probó la capacidad de inhibición de seis moléculas provenientes del extracto, así como también, cinco diluciones a partir de un stock de cada una de ellas.

Es importante considerar que efectivamente el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína puede ser intervenido mediante la interacción de moléculas con capacidades antioxidantes, evitando la formación de especies amiloides, así como también promoviendo la estabilización de estructuras monoméricas [53-55,58]. Es por esto, que se realizó un screening de las seis moléculas utilizando la dilución 5,0 mM del polifenol, y 20  $\mu$ M de la  $\alpha$ -sinucleína, siendo monitorizado mediante ThT a las 24 horas de incubación. De acuerdo con las lecturas obtenidas, se observó que solo una de las seis moléculas presentó un porcentaje de inhibición significativo frente al resto de las moléculas probadas; específicamente, la MLC6 presentó un 61% de inhibición, seguida de la MLC1 con un 15% de inhibición, la MLC5 presentó un 10% de inhibición, la MLC2-3 un 9% de inhibición y finalmente, la MLC4 un 8% de inhibición.

Posterior al screening, se realizó un ensayo de dosis-respuesta utilizando cinco concentraciones de la MLC6, específicamente 100  $\mu$ M; 75  $\mu$ M; 50  $\mu$ M; 25  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, siendo monitorizado con ThT tras 24 horas de incubación, observándose que 75  $\mu$ M presentó el mayor porcentaje de inhibición, con un 65%, seguido de 100  $\mu$ M con un 62%, 50  $\mu$ M con un 61%, 25  $\mu$ M con un 54% y finalmente, 10  $\mu$ M presentó un 44%. Por otra parte, se realizó el cálculo del IC<sub>50</sub> a partir de una regresión logarítmica, obteniendo que se necesita 27,98  $\mu$ M de la MLC6 para alcanzar la mitad del efecto inhibitorio de dicho polifenol.

Los ensayos de agregación *in vitro* se realizaron utilizando 20  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia de heparina, difiriendo de la concentración ideal descrita por Narkiewicz que es de 45  $\mu\text{M}$ , aunque correlacionándose con la concentración mínima para llevar a cabo el ensayo que es de 14  $\mu\text{M}$  [34].

Es importante destacar que el monitoreo de la agregación se realizó utilizando el marcador fluorescente ThT, debido principalmente a su capacidad de unirse específicamente a la hoja- $\beta$  presente en las fibras amiloides, así como también, a las laminillas de hoja- $\beta$  formadas durante la agregación [59,77], permitiéndonos discernir acerca del efecto de los polifenoles en estudio, en relación a las lecturas de fluorescencia, debido a que la intensidad de la emisión es directamente proporcional a la presencia de estructuras secundarias [59]. No obstante, es necesario considerar la presencia de variables como la heparina al momento de ser utilizada en los ensayos de agregación, debido a que se ha reportado el aumento exponencial en la fluorescencia, sin correlacionarse con la cinética de la agregación, a pesar de inducir la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína [75-76]. Es por esto, que posterior a los ensayos de dosis-respuesta, se determinó el efecto de la heparina frente a la capacidad inhibitoria de la MLC6, comparándose la actividad en presencia y ausencia del inductor, obteniéndose, luego de 24 horas de incubación una diferencia significativa entre ambos porcentajes de inhibición, específicamente se obtuvo un 12% de inhibición en presencia y un 62% en ausencia del inductor.

Dados los resultados obtenidos durante el monitoreo de la agregación a lo largo del estudio, se concluyó que el ThT es efectivo a la hora de permitir la cuantificación de hoja- $\beta$  presente en el ensayo de agregación *in vitro* [59], sin embargo, es necesaria la utilización de metodologías diferentes para corroborar dicha información, siendo la separación por medio de columna SEC, una herramienta importante para discernir acerca del tamaño y tiempo de retención

[66-67] que poseen las estructuras formadas en presencia y ausencia del polifenol en estudio.

Finalmente, la búsqueda de moléculas con capacidad anti-agregante, constituyen un campo aun no explorado en su totalidad, debido a la gran cantidad de polifenoles presentes en la dieta [56-57], sin embargo, es importante considerar que son necesarios estudios posteriores que permitan confirmar el tipo de estructuras formadas en presencia del polifenol, para realizar estudios a nivel celular para lograr identificar el efecto que poseen cada uno de ellos, a fin de buscar moléculas que logren disminuir la formación de especies oligoméricas, y por consecuencia, el avance de la patogenia de la EP [3,5].

## CAPÍTULO 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Rev Neurosci* 2001;2(7): 492-501.
2. Micheli F. Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados. 2ª edición, Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. 2006. pp. 1
3. Gonzalez-Horta A, Gonzalez B, Chavez-Montes A. Fluorescence as a tool to study lipid-protein interactions: The case of  $\alpha$ -synuclein. *Open J Biophys*. 2013;3(1A): 112-119.
4. Volpicelli-Daley L, Gamble K, Schultheiss C, Riddle D, West A, Lee V. Formation of  $\alpha$ -synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Mol Biol Cell* 2014;25(25): 4010-4023.
5. Lashuel H, Overk C, Oueslati A, Masliah E. The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 2013;14(1): 38-48.
6. Irwin D, M.-Y. Lee V, Trojanowski J. Parkinson's disease dementia: convergence of  $\alpha$ -synuclein, tau and amyloid- $\beta$  pathologies. *Nature Rev Neurosci* 2013;14(9): 626-636.
7. Ministerio de Salud. Guía Clínica Enfermedad de Parkinson. Santiago: Minsal; 2010.
8. Chaná P, Jiménez M, Díaz V, Juri C. Mortalidad por enfermedad de Parkinson en Chile. *Rev Med Chile* 2013;141(3): 327-331.
9. Juri C, Chaná P. Levodopa en la enfermedad de Parkinson: ¿Qué hemos aprendido? *Rev Med Chile* 2006;134(7): 893-901.
10. Guardingo M. Interfacial chemistry of catechol-based nanostructures [Tesis doctoral]. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Química. 2015.
11. Mazzulli J, Armakola M, Dumoulin M, Parastatidis I, Ischiropoulos H. Cellular oligomerization of  $\alpha$ -synuclein is determined by the interaction of

- oxidized catechols with a C-terminal sequence. *J Biol Chem* 2007;282(43): 31621-31630.
12. Cornejo A, Jiménez J, Caballero L, Melo F, Maccioni R. Fulvic acid inhibits aggregation and promotes disassembly of Tau fibrils associated with Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 2011; 27(1): 143-153.
  13. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 1988;8(8): 2804-2815.
  14. Dikiy I, Eliezer D. Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(4): 1013-1018.
  15. Breydo L, Wu J, Uversky V.  $\alpha$ -synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(2): 261-285.
  16. Villegas N, Chávez A, Montiel D, González B, González-Horta A. Análisis funcional de oligómeros de alfa-sinucleína en la permeabilidad de membranas. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2014;48(4): 437-445.
  17. Hong-Tao L, Hai-Ning D, Lin T, Jun H, Hong-Yu H. Structural transformation and aggregation of human  $\alpha$ -synuclein in Trifluoroethanol: non-amyloid component sequence is essential and  $\beta$ -sheet formation is prerequisite to aggregation. *Biopolymers* 2002;64(4): 221-226.
  18. Ullman O, Fisher CK, Stultz CM. Explaining the structural plasticity of  $\alpha$ -synuclein. *J Am Chem Soc* 2011;133(48): 19536-19546.
  19. Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of  $\alpha$ -synuclein aggregation. *J Neurochem* 2007;103(1): 17-37.
  20. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton M, Südhof TC.  $\alpha$ -synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 2010;329(5999): 1663-1667.
  21. Ben Gedalya T, Loeb V, Israeli E, Altschuler Y, Selkoe DJ, Sharon R.  $\alpha$ -synuclein and polyunsaturated fatty acids promote clathrin-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling. *Traffic* 2009;10(2): 218-234.
  22. Brown DR. Oligomeric alpha-synuclein and its role in neuronal death. *IUBMB Life* 2010;62(5): 334-339.



23. Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rane A, Andersen JK. Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci Lett* 2010;486(3): 235-239.
24. Davis K, Charney D, Coyle J, Nemeroff C. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. 5a ed. Filadelfia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
25. Kragh CL, Ubhi K, Wyss-Corey T, Masliah E. Autophagy in dementias. *Brain Pathol* 2012;22(1): 99-109.
26. Wakabayashi K, Kunikazu T, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of  $\alpha$ -synuclein aggregates. *Neuropathology* 2007;27(5): 494-506.
27. Trinh J, Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2013;9(8): 445-454.
28. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006;296(6): 661-670.
29. Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznaï B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998;18(3): 262-265.
30. Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muentner M, DeVrieze FW, Crook R, Perez-Tur J, Lincoln S, Maraganore D, Adler C, Newman S, MacElwee K, McCarthy P, Miller C, Waters C, Hardy J. A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet* 1999;8(1): 81-85.

31. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392(6676): 605-608.
32. Pacheco C. Efectos de  $\alpha$ -sinucleína en neuronas del sistema nervioso central. [tesis doctoral]. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas. 2013.
33. Fauerbach J. Caracterización de las etapas tempranas de la agregación de alfa-sinucleína in vitro mediante sondas fluorescentes ESIPT y microscopia de fuerza atómica. [tesis doctoral]. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 2013.
34. Narkiewicz J, Giachin G, Legname G. In vitro aggregation assays for the characterization of  $\alpha$ -synuclein prion-like properties. *Prion* 2014;8(1):19-32.
35. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DMA, Hasegawa M. Prion-like spreading of pathological  $\alpha$ -synuclein in brain. *Brain* 2013;136(4): 1128-1138.
36. Van Raaij ME, van Gestel J, Segers-Nolten IM, de Leeuw SW, Subramaniam V. Concentration dependence of alpha-synuclein fibril length assessed by quantitative atomic force microscopy and statistical-mechanical theory. *Biophys J* 2008;95(10): 4871-4878.
37. Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 2000; 289(5483): 1317-1321.
38. Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* 2001;276(14): 10737-10744.
39. Giehm L, Lorenzen N, Otzen DE. Assays for  $\alpha$ -synuclein aggregation. *Methods* 2011;53(3): 295-305.
40. Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M. Different species of alpha-

synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 2007;27(34): 9220-9232.

41. Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Brown GG, Richardson RJ. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. *Neurology* 1997;48(3): 650-658.
42. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005; 8(1): 79-84.
43. Ingelsson M. Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other Lewy body disorders. *Front Neurosci* 2016;10(408): 1-10.
44. Deas E, Cremades N, Angelova PR, Ludtmann MHR, Yao Z, Chen S, Horrocks MH, Banushi B, Little D, Devine MJ, Gissen P, Klenerman D, Dobson CM, Wood NW, Gandhi S, Abramov AY. Alpha-synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2016;24(7): 376-391.
45. Cremades N, Cohen SI, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, Sandal M, Clarke RW, Dunne P, Aprile FA, Bertocini CW, Wood NW, Knowles TP, Dobson CM, Klenerman D. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of  $\alpha$ -synuclein. *Cell* 2012;149(5): 1048-1059.
46. Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rane A, Andersen JK. Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy *in vivo*. *Neurosci Lett* 2010;486(3): 235-239.
47. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, Cooper JM. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis* 2011;42(3): 360-367.
48. Goedert M, Masuda-Suzukake M, Falcon B. Like prions: the propagation of aggregated tau and  $\alpha$ -synuclein in neurodegeneration. *Brain* 2016;1(1): 1-13.

49. Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(9): 1835-1849.
50. Tsigelny IF, Sharikov Y, Wrasidlo W, González T, Desplats PA, Crews L, Spencer B, Masliah E. Role of  $\alpha$ -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *FEBS J* 2012;279(6): 1000-1013.
51. Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(47): 20051-20056.
52. Martín M, Elvira L, Gutiérrez JR. Fenómenos on-off de conducta en la enfermedad de Parkinson. *Psiquiatr Biol* 2003;10(1): 36-41.
53. De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, Labajos MT, González-Correa JA. Role of catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. *J Nutr Biochem* 2015;26(5): 549-555.
54. Felipe ET, Maestri JS, Kanunfre CC, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR, Oliveira-Emilio HR. Cytotoxicity and cytoprotective effects of citrus flavonoids on insulin-secreting cells BRIN-BD11: beneficial synergic effects. *Nat Prod Res* 2013;27(10): 925-928.
55. Afonso MS, de O Silva AM, Carvalho EB, Rivelli DP, Barros SB, Rogero MM, Lottenberg AM, Torres RP, Mancini-Filho J. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Nutr Metab (Lond)* 2013;10(1): 1-9.
56. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, Willey C, Senoo H, Umezono Y, Sanada C, Barikmo I, Berhe N, Willet WC, Phillips KM, Jacobs DR Jr, Blomhoff R. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* 2010;9(3): 1-11

57. Mazzulli JR, Mishizen AJ, Giasson BI, Lynch DR, Thomas SA, Nakashima A, Nagatsu T, Ota A, Ischiropoulos H. Cytosolic catechols inhibit  $\alpha$ -synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates. *J Neurosci* 2006;26(39): 10068-10078.
58. Lorenzen N, Nielsen SB, Yoshimura Y, Vad BS, Andersen CB, Betzer C, Kaspersen JD, Christiansen G, Pedersen JS, Jensen PH, Mulder FAA, Otzen DE. How epigallocatechin gallate can inhibit  $\alpha$ -synuclein oligomer toxicity in vitro. *J Biol Chem* 2014;289(31): 21299-21310.
59. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804(7): 1405-12.
60. Amdursky N, Erez Y, Huppert D. Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker. *Acc Chem Res* 2012;45(9): 1548-1557.
61. Munishkina LA, Fink AL. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768(8): 1862-1885.
62. Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schütz A, Heinemann U, Yokoyama S, Büsow K, Gunsalus KC. Protein production and purification. *Nat Methods* 2008;5(2): 135-146.

63. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A review. *Methods Enzymol* 2009;463(27): 439-473.
64. Bell CE, Lewis M. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nat Struct Biol* 2000;7(3): 209-214.
65. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol* 2000;326(1): 245-254.
66. Hong P, Koza S, Bouvier E. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2012;35(20): 2923-2950.
67. Irvine G. High-performance size-exclusion chromatography of peptides. *J Biochem Biophys Methods* 2003;56(1-3): 233-242.
68. Everett-Patriquin MB. pET28a-c(+) TB074 10/98. Novagen.
69. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259): 680-685.
70. Held P. Quantitation of peptides and amino acids with a Synergy™ HT using UV fluorescence. BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Winooski, Vermont, USA, Copyright © 2006.
71. Hoyer W., Antony T., Cherny D., Heim G., Jovin T.M. and Subramaniam V. Dependence of  $\alpha$ -Synuclein Aggregate Morphology on Solution Conditions. *J Mol Biol* 2002;322(2): 383–393. (2002).
72. Huang C, Ren G, Zhou H, Wang CC. A new method for purification of recombinant human  $\alpha$ -synuclein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2016;1864(10): 1419-1417.
73. Hage D. Handbook of affinity chromatography. 2da ed. Nebraska: CRC Press; 2005.
74. Lacowicz JR. Protein fluorescence. In: Topics in fluorescence spectroscopy. Vol. 6. New York: Kluwer Academic Publishers; 2002.
75. Torres-Bugeau CM, Ávila CL, Raisman-Vozari R, Papy-Garcia D, Itri R, Barbosa LRS, Cortez LM, Sim VL, Chehín RS. Characterization of heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase early amyloid-like

oligomers and their implication in  $\alpha$ -synuclein aggregation. *J Biol Chem* 2012;287(4): 2398-2409.

76. Nielsen S, Yde P, Giehm L, Sundbye S, Christiansen G, Mathiesen J, Jensen M, Jensen P, Otzen D. Multiples roles of heparin in the aggregation of p25a. *J Mol Biol* 2012;421(4-5): 601-615.
77. Mučibabić M, Apetri MM, Canters GW, Aartsma TJ. The effect of fluorescent labeling on  $\alpha$ -synuclein fibril morphology. *Biochim Biophys Acta* 2016;1864(10): 1419-1427.
78. Ardah MT, Paleologou KE, Lv G, Abul Khair SB, Kazim AS, Minhas ST, Al-Tel TH, Al-Hayani AA, Haque ME, Eliezer D, El-Agnaf OMA. Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of  $\alpha$ -synuclein fibril formation and toxicity. *Front Aging Neurosci* 2014;6(197): 1-17.